



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109642251 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 19

(21) 申请号 201780040770.0

(22) 申请日 2017.06.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109642251 A

(43) 申请公布日 2019.04.16

(30) 优先权数据
1611469.6 2016.06.30 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2017/051927 2017.06.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/002649 EN 2018.01.04

(73) 专利权人 卢米拉特英国有限公司
地址 英国伦敦

(72) 发明人 J. 普罗文斯 D. 沈 B. 克雷纳克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 彭昶 罗文锋

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6848 (2018.01)
B01L 7/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104357546 A, 2015.02.18
WO 2005118144 A1, 2005.12.15
WO 2007028833 A3, 2007.08.02
US 2009017453 A1, 2009.01.15
US 2003082590 A1, 2003.05.01
De-Guo Wang等. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. 《Molecules》. 2015, 第20卷(第4期), 第6048-6059页.

审查员 刘慧

权利要求书2页 说明书21页 附图27页

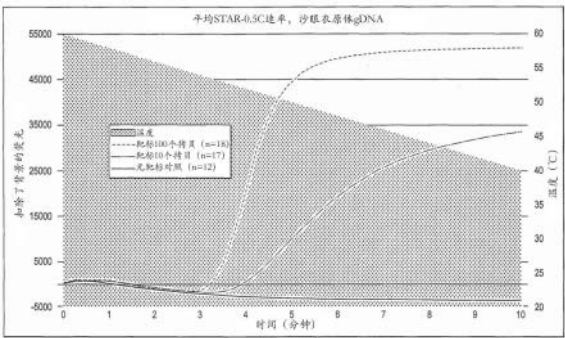
(54) 发明名称

核酸扩增过程中的改进或与核酸扩增过程相关的改进

(57) 摘要

披露了一种进行非等温核酸扩增反应的方法, 该方法包括以下步骤: (a) 在允许杂交事件的条件将靶标序列与一种或多种互补单链引物混合, 其中这些引物与该靶标杂交, 该杂交事件直接或间接导致形成包含两个切口位点的双链体结构, 这两个切口位点位于该双链体的相反两端处或附近; 并通过以下步骤执行扩增过程; (b) 在该双链体的链中的每个所述切口位点处产生切口; (c) 使用聚合酶延伸带切口的链以便形成新合成的核酸, 该延伸用聚合酶重新产生切口位点; (d) 根据需要重复步骤(b)和(c), 以便导致产生该新合成的核酸的多个拷贝; 其特征在于, 执行该方法的温度是非等温的, 并且在步骤(b) -

(d) 的该扩增过程中经历至少2℃的降低。



1. 一种进行非等温核酸扩增反应的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 在允许杂交事件的条件下将靶标序列与一种或多种互补单链引物混合,其中所述引物与该靶标杂交,该杂交事件直接或间接导致形成包含两个切口位点的双链体结构,这两个切口位点位于该双链体的相反两端处或附近;并通过以下步骤执行扩增过程;

(b) 在该双链体的链中的每个所述切口位点处产生切口;

(c) 使用聚合酶延伸带切口的链以便形成新合成的核酸,该用聚合酶进行的延伸重新产生切口位点;

(d) 根据需要重复步骤(b)和(c),以便导致产生该新合成的核酸的多个拷贝;

其特征在于,执行该方法的温度是非等温的,并且在步骤(b)-(d)的该扩增过程中经历至少2°C的降低。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(a)中,该靶标包含两条互补的核酸链,并且所述引物是正向引物和反向引物,这些正向引物和反向引物各自与该靶标的相应链互补,使得这些正向引物和反向引物的3'末端朝向彼此取向。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在该扩增反应期间,该温度经历至少5°C的受控降低。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中该扩增反应期间的平均温度降低速率在-0.10°C min⁻¹至-6.0°C min⁻¹的范围内。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中步骤(b)-(d)基本上在步骤(a)之后立即执行。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)在55°C至62°C范围内的温度下执行。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括直接或间接检测该新合成的核酸的步骤。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述检测步骤包括使用分子信标或荧光染料、横向流标记的探针或催化电化学反应的酶。

9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中步骤(b)包括使用切口酶。

10. 根据权利要求1或2所述的方法,该方法包括使用具有最佳温度的第一聚合酶和/或第一切口酶,和具有最佳温度的第二聚合酶和/或第二切口酶,其中该第二聚合酶和/或第二切口酶的最佳温度低于相应第一聚合酶和/或第一切口酶的最佳温度。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中该第二聚合酶是Bsu聚合酶、或是DNA聚合酶的克隆片段。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中该扩增反应的初始温度等于或高于该第一切口酶的最佳温度,并且在该扩增反应过程中该温度降低至低于该第一切口酶的最佳温度的温度。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中该扩增反应的温度降低至或低于该第二聚合酶和/或第二切口酶的最佳温度。

14. 根据权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括使通过执行该方法而获得的混合物与降解核酸的不耐热的酶接触的步骤,该混合物在该不耐热的酶具有实质性活性的温度下与该不耐热的酶接触。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中该酶是鳕鱼尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)或南极不耐热UDG。

16. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中在步骤(a)之前执行逆转录步骤, 包括使所关注的RNA分析物与逆转录酶接触, 以便形成该所关注的RNA分析物的DNA转录物。

17. 根据权利要求16所述的方法, 该方法进一步包括从该DNA转录物制备双链DNA的步骤。

18. 根据权利要求1或2所述的方法, 该方法进一步包括预扩增或富集步骤。

19. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中单链引物中的一种或多种包含经修饰的核苷酸。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中该经修饰的核苷酸位于该引物的靶标互补部分中。

21. 根据权利要求19所述的方法, 其中该一种或多种引物包含2'-修饰的核苷酸。

22. 根据权利要求19所述的方法, 其中该一种或多种引物包含2'-O-甲基修饰的核苷酸。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中该一种或多种引物包含多个2'-O-甲基修饰的核苷酸。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中该一种或多种引物包含最多七个2'-O-甲基修饰的核苷酸。

25. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中步骤(b) - (d)期间的反应温度不回到执行步骤(a)的温度。

26. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中该反应温度不回到预定温度。

27. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中单链引物中的一种或多种包含自身互补部分。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中该自身互补部分形成发夹结构。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中该发夹包含5至10个碱基对。

30. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中步骤(b) - (d)期间的该温度降低的幅度在8℃至20℃的范围内。

31. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中在该扩增反应期间, 该温度经历至少10℃的受控降低。

32. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中在该扩增反应期间, 该温度经历至少15℃的受控降低。

33. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中该扩增反应期间的平均温度降低速率在-0.20℃ min⁻¹至-3.5℃ min⁻¹的范围内。

34. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中该扩增反应期间的平均温度降低速率在-0.30℃ min⁻¹至-3.5℃ min⁻¹的范围内。

35. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中该扩增反应期间的平均温度降低速率在-0.40℃ min⁻¹至-3.5℃ min⁻¹的范围内。

36. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中步骤(a) - (d)在相同的反应容器中或在相同的固体支持物上执行。

37. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中步骤(a)在57℃至61℃范围内的温度下执行。

38. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中步骤(a)在58℃至60℃范围内的温度下执行。

核酸扩增过程中的改进或与核酸扩增过程相关的改进

技术领域

[0001] 本发明涉及一种扩增核酸的方法和执行该方法的设备。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应 (PCR) 是第一种用于扩增DNA的广泛使用的体外方法。尽管非常强大,但该技术需要使用热循环设备使反应混合物经历周期性的温度变化以便实现扩增。因此,PCR并不特别适合在实验室环境之外使用,例如在护理点 (“PoC”) 诊断装置的背景下。

[0003] 设计了许多不同的等温扩增技术部分地克服了这个缺点,这些技术避免了对热循环的需要。此类技术包括例如:信号介导的RNA扩增技术 (“SMART”;WO 99/037805);基于核酸序列的扩增 (“NASBA”Compton 1991Nature 350,91-92 (Compton,1991年,《自然》,第350卷,第91-92页));滚环扩增 (“RCA”,例如参见Lizardi et al.,1998Nature Genetics 19,225-232 (Lizardi等人,1998年,《自然遗传学》,第19卷,第225-232页));环介导的扩增 (“LAMP”参见Notomi et al.,2000Nucl.Acids Res.28,(12)e63 (Notomi等人,2000年,《核酸研究》,第28卷第12期,第e63页));重组酶聚合酶扩增 (“RPA”参见Piepenberg et al.,2006PLoS Biology 4(7)e204 (Piepenberg等人,2006年,《PLoS生物学》,第4卷第7期,第e204页));链置换扩增 (“SDA”);解旋酶依赖性扩增 (“HDA”Vincent et al.,2004EMBO Rep.5,795-800 (Vincent等人,2004年,《欧洲分子生物学会报告》,第5卷,第795-800页));转录介导的扩增 (“TMA”),单引物等温扩增 (“SPIA”参见Kurn et al.,2005Clinical Chemistry 51,1973-81 (Kurn等人,2005年,《临床化学》,第51卷,第1973-1981页));自主序列复制 (“3SR”);以及切口酶扩增反应 (“NEAR”)。

[0004] SDA是这样一种技术(由Walker et al.,1992Nucl.Acids Res.20,1691-1696 (Walker等人,1992年,《核酸研究》,第20卷,第1691-1696页)披露),它涉及使用在包含靶标互补部分的一对引物的上游的一对短“缓冲”引物以及在该靶标互补部分的5'的用于核酸内切酶的识别及切割位点。“缓冲”引物通过产生用于引物扩增的互补单链靶标来帮助引发SDA反应。引物与相应的互补单链靶标分子杂交。使用包含DNA聚合酶和至少一种经修饰的核苷三磷酸的反应混合物,使用引物作为模板来延伸靶标链的3'末端(同样地,使用靶标作为模板来延伸引物的3'末端)。

[0005] 靶标链的延伸产生核酸内切酶的双链识别位点。然而,因为使用经修饰的三磷酸延伸靶标,所以核酸内切酶不切割两条链,而是在引物中产生单链切口。然后通过DNA聚合酶(典型地是DNA聚合酶I的克列诺 (Klenow) 片段,该片段缺乏核酸外切酶活性)延伸切口处的3'末端。随着带切口的引物延伸,它们置换最初产生的延伸产物。然后,被置换的产物自由地与相反的引物杂交,因为它基本上复制了该相反引物的靶标序列。以这种方式,实现了靶标序列的两条链的指数扩增。

[0006] SDA过程的扩增阶段基本上是等温的,典型地在37℃下执行,这是核酸内切酶和聚合酶的最佳温度。然而,在达到扩增阶段之前,必须将双链靶标完全解离成其组成单链,以使该对引物与其互补的靶标链杂交。

[0007] 这种解离或“解链”通常通过将双链靶标加热至高温(通常约90℃)以破坏靶标的两条链之间的氢键而完成。然后冷却反应混合物以允许添加扩增反应所必需的酶。由于用于产生单链靶标的高温,SDA技术不是很适合PoC环境。

[0008] US 6,191,267披露了N.BstNBI切口酶的克隆和表达及其在SDA中代替限制性核酸内切酶和经修饰的三磷酸的用途。

[0009] 另一种类似于SDA的扩增技术是切口酶扩增反应(或“NEAR”)。

[0010] 在“NEAR”中(例如,如US 2009/0017453和EP 2,181,196中所披露的),正向引物和反向引物(在US 2009/0017453和EP 2,181,196中称为“模板”)与双链靶标的相应链杂交并延伸。正向引物和反向引物(过量存在)的另外拷贝与相反引物的延伸产物杂交,并且自身延伸,从而产生“扩增双链体”。如此形成的每个扩增双链体包含朝向每条链的5'末端的切口位点,该切口位点被切口酶产生切口,从而允许合成另外的延伸产物。先前合成的延伸产物可以同时与互补引物的另外拷贝杂交,从而使引物延伸,并因而产生“扩增双链体”的另外拷贝。以这种方式,可以实现指数扩增。

[0011] NEAR与SDA的不同之处尤其在于,不需要“缓冲”引物和初始热解离步骤。触发扩增过程所需的初始引物/靶标杂交事件在靶标仍然基本上呈双链时发生:认为,初始引物/靶标杂交利用靶标链的局部解离,这种现象称为“呼吸”(参见Alexandrov et al., 2012Nucl. Acids Res. (Alexandrov等人,2012年,《核酸研究》);和Von Hippel et al., 2013Biopolymers 99(12),923-954(Von Hippel等人,2013年,《生物聚合物》,第99卷第12期,第923-954页)的综述)。呼吸是DNA链之间碱基配对的局部和瞬时松动。初始引物/靶标异源双链体的解链温度(T_m)典型地远低于反应温度,因此趋势是引物解离,但瞬时杂交持续足够长的时间使聚合酶延伸引物,这会增加异源双链体的 T_m 并使之稳定。

[0012] NEAR中的扩增阶段在恒定的温度下等温执行。实际上,常规的是都在相同的恒定温度下执行初始靶标/引物杂交和随后的数轮扩增,该恒定温度通常在54℃至56℃的范围内。

[0013] 避免了对热循环的需要意味着在PoC环境中等温技术可能比PCR更有用。此外,即使从非常低拷贝数的靶标分子(例如少至10个双链靶标分子)开始,也可以实现大量扩增产物的合成。

[0014] WO 2011/030145(英格曼医疗诊断产品有限公司(Enigma Diagnostics Limited))披露了在温度振荡条件下进行的“等温”核酸扩增反应,其中最初在预定温度下进行反应,使温度从预定温度上下偏离,然后在扩增反应期间使温度至少恢复到预定温度一次。更典型地,使温度从预定温度向上和向下少量“摆动”(约5℃)。

[0015] 本发明的目的尤其是提供改进的核酸扩增技术,该技术具有优于现有技术的一个或多个优点,包括例如缩短的反应时间、和/或增加的产量和/或减少的非特异性扩增产物。

发明内容

[0016] 在第一方面,本发明提供了进行非等温核酸扩增反应的方法,该方法包括以下步骤:

[0017] (a) 在允许杂交事件的条件下将靶标序列与一种或多种互补单链引物混合,其中这些引物与该靶标杂交,该杂交事件直接或间接导致形成包含两个切口位点的双链体结

构,这两个切口位点位于该双链体的相反两端处或附近;并通过以下步骤执行扩增过程;

[0018] (b) 在该双链体的链中的每个所述切口位点处产生切口

[0019] (c) 使用聚合酶延伸带切口的链以便形成新合成的核酸,该用聚合酶延伸重新产生所述切口位点;

[0020] (d) 根据需要重复步骤(b)和(c),以便导致产生该新合成的核酸的多个拷贝;

[0021] 其特征在于,执行该方法的温度是非等温的,并且在步骤(b)-(d)的该扩增过程中经历至少2℃、优选至少5℃的降低。

[0022] 在第二方面,本发明提供了用于执行本发明第一方面的方法的设备,该设备包括温度调节器件和可编程控制器件,该可编程控制器件被编程为操作该温度调节器件以在用于执行该第一方面的方法的反应混合物的扩增过程中执行至少2℃、优选至少5℃的温度降低。

[0023] 本发明的方法的扩增过程可以应用于众所周知的和常规的扩增技术,这些技术包括SDA和NEAR。

[0024] 因此,例如,扩增过程可以基于链置换扩增中采用的扩增过程,或者基于NEAR中使用的扩增过程或实际上依赖于产生单链切口及随后从切口链的3'末端延伸的任何其他核酸扩增过程。因此,与SDA或NEAR的扩增阶段相关的现有技术的传授内容一般将同样适用于本发明的方法的扩增过程(除了与维持扩增期间的恒定温度相关的现有技术的传授内容之外)。

[0025] 优选地,步骤(a)包括将含有双链靶标的样品与两种单链引物混合,所述引物中的一种与靶标的第一链互补,并且所述引物中的另一种与靶标的第二链互补,使得两种引物与靶标杂交,并且所述引物的游离3'末端彼此面对。

[0026] 两种引物可以方便地称为“正向”引物和“反向”引物。

[0027] 理想地,正向引物和反向引物都将包含切口酶识别位点的序列。典型地,由切口酶产生的切口将正好在切口酶识别位点的外部并且典型地在切口酶识别位点的3'。

[0028] 在一个优选的实施例中,正向引物将包含在其3'末端处或附近的部分,该部分与靶标序列反义链的3'末端互补并且可与之杂交,而反向引物包含在其3'末端处或附近的部分,该部分与靶标序列有义链的3'末端互补并且可与之杂交。

[0029] 以这种方式,在靶标序列的相反两端引入切口酶识别位点,并且靶标序列(与切口位点下游的引物的任何间插序列一起)的扩增通过以下方式完成:执行正向引物和反向引物的聚合酶延伸的多个循环以便形成双链切口位点,并且用切口酶切割切口位点,从而允许通过聚合酶等进一步延伸切口引物,基本上如例如US 2009/0017453中所披露的那样,其内容通过援引并入本文。

具体实施方式

[0030] 本发明尤其涉及一种用于扩增所选的靶标核酸的方法。

[0031] 该靶标可以是单链的、双链的,或包含两者的混合物。该靶标可包括RNA、DNA或两者的混合物。特别地,该靶标可以包含一种或多种经修饰的核苷三磷酸(即,在天然存在的核酸中通常未发现的核苷三磷酸),尽管这不是必需的并且实际上不是优选的。

[0032] 该靶标可以选自以下非详尽列表:基因组核酸(该术语涵盖任何动物、植物、真菌、

细菌或病毒的基因组核酸)、质粒DNA、线粒体DNA、cDNA、mRNA、rRNA、tRNA或合成的寡核苷酸或其他核酸分子。

[0033] 特别地,该方法可另外包括初始逆转录步骤。例如,RNA(例如病毒基因组RNA、或细胞mRNA、或来自一些其他来源的RNA)可以通过本领域技术人员熟知的方法使用逆转录酶来合成DNA或cDNA。然后可以将DNA用作本发明方法中的靶标序列。原始RNA典型地会被逆转录酶的核糖核酸酶活性降解,但是如果需要,可在逆转录完成后添加另外的核糖核酸酶H。RNA分子通常以比相应的(例如基因组)DNA序列更大的拷贝数存在于样品中,因此可以方便地从RNA分子制备DNA转录物以便有效地增加DNA序列的拷贝数。

[0034] “靶标序列”是靶标核酸中的碱基序列,并且可以指双链靶标的有义链和/或反义链,并且除非上下文另有规定,否则还涵盖与初始靶标核酸的以扩增的拷贝数再生的或复制的延伸产物或扩增产物相同的碱基序列。

[0035] 靶标序列可以存在于任何种类的样品中,例如生物或环境样品(水、空气等)。生物样品可以是例如食物样品或临床样品。临床样品可包括以下这些:尿液、唾液、血液、血清、血浆、粘液、痰液、泪液或粪便。

[0036] 在与引物接触之前,样品可以或可以不经过处理。这种处理可包括以下一个或多个方面:过滤、浓缩、部分纯化、超声处理、裂解等。此类方法是本领域技术人员熟知的。

[0037] 本发明的方法涉及使用切口位点和用于在切口位点处产生切口的手段。“切口”是完全或至少部分双链核酸分子的仅一条链的磷酸二酯骨架的切割。切口位点是分子中产生切口的位置。

[0038] 在优选的实施例中,“切口识别位点”将存在于切口位点处、内部或附近。(在该上下文中“附近”意指切口识别位点的最近碱基在切口位点的10个碱基内,优选在切口位点的5个碱基内)。

[0039] 切口识别位点可以包含限制性核酸内切酶识别位点的至少一条链,并且切口位点可以包含核酸碱基序列的至少一条链,该核酸碱基序列当作为双链分子存在时,被限制性核酸内切酶切割。典型地,限制性核酸内切酶将切割双链核酸分子的两条链。在本发明中,通过在切口位点处或附近掺入一个或多个经修饰的碱基可以避免双链断裂,这些经修饰的碱基使得核酸链不易被限制性核酸内切酶切割。以这种方式,通常切割双链核酸分子的两条链的限制性核酸内切酶可用于将单链切口引入双链分子中。适于实现此目的经修饰的碱基等是本领域技术人员熟知的,并且包括例如所有 α 磷酸修饰的核苷三磷酸和 α 硼代修饰的核苷三磷酸,具体地讲;2'-脱氧腺苷5'-O-(硫代三磷酸)、5-甲基脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-脱氧尿苷5'-三磷酸、7-脱氮-2'-脱氧鸟苷5'-三磷酸、2'-脱氧鸟苷-5'-O-(1-硼代三磷酸)和其他核苷三磷酸。包含经修饰的碱基的三磷酸盐可以存在于用于执行扩增过程的反应混合物中,使得在后续数轮扩增期间在相关的位置掺入经修饰的碱基,以防止形成可被核酸内切酶切割的位点。

[0040] 然而,在优选的实施例中,通过切口酶在切口位点产生切口。这些酶是在正常情况下仅在双链核酸分子中产生单链断裂的酶。切口酶具有切口识别位点,并且切口位点可以在切口识别位点内,或者可以是识别位点的5'或3'。许多切口酶是本领域技术人员已知的并且是可商购获得的。切口酶的实例的非穷举列表包括:Nb.BsmI、Nb.Bts、Nt.AlwI、Nt.BbvC、Nt.BstNBI和Nt.Bpu10I。后一种酶可从赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher

Scientific) 商购获得; 其他的可从例如新英格兰生物学实验室公司 (New England Biolabs) 获得。

[0041] 在优选的实施例中, 在方法开始时将切口酶引入反应混合物中 (例如, 在使样品与引物和DNA聚合酶接触的一分钟内)。然而, 在一些情况下, 可能需要在较长的延迟后将切口酶引入反应混合物中 (例如, 以使温度降至更接近切口酶的最佳温度)。

[0042] 本发明的方法涉及使用DNA聚合酶。优选地, 本发明的方法包括使用至少一种嗜热DNA聚合酶 (即, 具有超过60°C的最佳温度)。优选地, DNA聚合酶是链置换聚合酶。优选地, DNA聚合酶不具有核酸外切酶活性。优选地, DNA聚合酶是没有核酸外切酶活性的链置换聚合酶, 并且还优选地是嗜热的。

[0043] 优选的DNA聚合酶的实例包括Bst聚合酶、Vent® DNA聚合酶、9°N聚合酶、Manta 1.0聚合酶 (凯杰公司 (Qiagen))、BstX聚合酶 (凯杰公司) 和Bsm DNA聚合酶、大片段 (赛默飞世尔科技公司)。

[0044] 在一些实施例中, 本发明的方法可以方便地包括预扩增或富集步骤。这是使靶标序列与正向引物和反向引物以及DNA聚合酶接触但无切口酶的步骤。这典型地持续约2至5分钟并产生约1,000倍的靶标序列的初始 (线性) 扩增, 如果靶标序列以低拷贝数存在于样品中, 这可能是特别有用的。

[0045] 在一些实施例中, 使用嗜中温DNA聚合酶诸如得自海洋泉古菌亲缘种 (Cenarchaeum symbiosum) 的Exo-Minus克列诺DNA聚合酶或Exo-Minus嗜冷DNA聚合酶, 在低于50°C的温度下执行预扩增或富集步骤, 随后将混合物加热至高于50°C的温度, 以使不耐热DNA聚合酶变性或失活, 然后添加嗜热DNA聚合酶用于下游扩增。

[0046] 典型地, 本发明的方法包括检测步骤, 其中检测扩增过程的一种或多种直接或间接产物并任选地进行定量, 这表明样品中靶标的存在性和/或量。已知有许多合适的检测和/或定量技术, 包括: 凝胶电泳、质谱、横向流捕获、掺入带标记的核苷酸、嵌入染料、分子信标和其他探针, 尤其是特异性杂交的寡核苷酸或其他含核酸的分子。

[0047] 在检测步骤中检测到的一种或多种产物在本文中可称为“检测靶标”。与检测步骤相关的“靶标”不一定与扩增过程中的“靶标”相同, 实际上两种分子通常至少在某种程度上是不同的, 尽管它们可能具有一些共同的序列 (通常为10至20个碱基), 其中检测靶标包含核酸分子或寡核苷酸。

[0048] 核酸检测方法可以采用允许特异性检测双链DNA的染料。在与DNA或RNA结合时表现出增强荧光的嵌入染料是熟知的。染料可以是例如DNA或RNA嵌入荧光团, 并且可以尤其包括以下这些: 吖啶橙、溴化乙锭、Pico Green、碘化丙啶、SYBR I、SYBR II、SYBR Gold、TOTO-3 (噻唑橙二聚体) Oli Green和YOYO (噻唑黄二聚体)。

[0049] 核酸检测方法还可以采用直接掺入到检测靶标序列中的或含有与所关注的检测靶标互补或基本互补的序列的探针中的带标记核苷酸。合适的标记可以是放射性的和/或荧光的, 并且可以由本领域常规的任何方式分辨。可以被检测但是以其他方式起天然核苷酸的作用 (例如, 被天然酶识别并且可以作为天然酶的底物) 的带标记核苷酸将与经修饰的核苷酸不同, 后者不起天然核苷酸的作用。

[0050] 可以使用分子信标来检测和监测靶标核酸和核酸序列的存在性和/或量。分子信标是发夹状寡核苷酸, 其一端含有荧光团, 相反一端含有淬灭染料 (“淬灭剂”)。发夹的环包

含与检测靶标序列互补或基本上互补的探针序列,而茎通过对位于探针序列任一侧的自身互补或基本上自身互补的序列的退火来形成。

[0051] 荧光团和淬灭剂结合在信标的相反两端处。在阻止分子信标与其靶标杂交的条件下或当分子信标在溶液中游离时,荧光团和淬灭剂彼此接近,从而防止荧光。当分子信标遇到检测靶标分子时,发生杂交;环结构转变成稳定的、更刚性的构象,导致荧光团和淬灭剂分离,从而发生荧光(Tyagi et al.1996,Nature Biotechnology 14:303-308(Tyagi等人,1996年,《自然生物技术》,第14卷,第303-308页))。由于探针的特异性,荧光的产生基本上完全归因于预期的扩增产物/检测靶标的存在。

[0052] 分子信标是高度特异性的,并且可以区分差异在于单个碱基的核酸序列(例如,单核苷酸多态性)。分子信标可以用不同颜色的荧光团和不同的检测靶标互补序列合成,使得同一反应中的若干不同的检测靶标能够被同时检测和/或定量,从而允许单个PoC测定的“多重化”以检测多种不同的病原体或生化标记物。对于定量扩增过程,分子信标可以在扩增后特异性结合到扩增的检测靶标,并且因为非杂交的分子信标不发荧光,所以不必分离探针-靶标杂交体就能定量测定扩增产物的量。所产生的信号与扩增产物的量成比例。这可以实时完成。与其他实时格式一样,必须针对每个引物/探针组优化特定的反应条件,以确保准确度和精确度。

[0053] 还可以通过荧光共振能量转移(FRET)对检测靶标核酸和核酸序列的产生或存在进行检测和监测。FRET是以下两种荧光团之间的能量转移机制:供体和受体分子。简而言之,供体荧光团分子在特定的激发波长下被激发。当供体分子返回其基态时由供体分子产生的随后发射可以将激发能量转移到受体分子(通过长程偶极-偶极相互作用)。FRET是量化分子动力学的有用工具,例如,在如分子信标所见到的一样的DNA-DNA相互作用中。为了监测特定产物的产生,探针可以在一端用供体分子标记,在另一端用受体分子标记。探针-检测靶标的杂交引起供体和受体的距离或取向的变化,并观察到FRET性质的变化。(Joseph R.Lakowicz.“Principles of Fluorescent Spectroscopy”,Plenum Publishing Corporation,2nd edition(July 1,1999)(Joseph R.、Lakowicz.,“荧光光谱学原理”,普莱南出版公司,第2版,1999年7月1日))。

[0054] 检测靶标核酸的产生或存在也可以通过横向流装置检测和监测。横向流装置是熟知的。这些装置通常包括固相流体可渗透的流动路径,流体通过毛细管力流过该流动路径。实例包括但不限于试纸测定和具有各种适当涂层的薄层色谱板。固定在流动路径中或流动路径上的是用于样品、结合伴侣或涉及样品的结合伴侣的缀合物的各种结合试剂,以及信号产生系统。分析物的检测可以按若干不同的方式实现,这些方式包括:酶检测、纳米粒子检测、比色检测和荧光检测。酶检测可涉及酶标记的探针,这些探针与横向流装置表面上的互补或基本上互补的核酸检测靶标杂交。可以用合适的标记物处理所得的复合物以产生可读信号。纳米粒子检测涉及可以使用胶体金、乳胶和顺磁性纳米粒子的珠粒技术。在一个实例中,珠粒可以与抗生物素抗体缀合。靶标序列可以直接生物素化,或者靶标序列可以与序列特异性生物素化探针杂交。金和乳胶产生肉眼可见的比色信号,而顺磁性粒子在磁场中激发时产生非视觉信号并且可由专门的阅读器解读。

[0055] 基于荧光的横向流检测方法也是已知的,例如,双重荧光素和生物素标记的寡核苷酸探针方法,或使用量子点。

[0056] 核酸也可以捕获在横向流装置上。捕获手段可包括抗体依赖性和抗体非依赖性方法。抗体非依赖性捕获通常使用两个结合伴侣之间的非共价相互作用,例如,生物素化探针与链霉亲和素捕获分子之间的高亲和力和不可逆键合。捕获探针可以直接固定在横向流膜上。

[0057] 本发明的整个方法或至少该方法的扩增过程部分可以在反应容器(例如传统的实验室塑料试剂管,例如得自 Eppendorf®)中执行,或者可以在固相载体中和/或上执行。固相载体可以是多孔的或无孔的。在一个具体实施例中,固相载体可包含多孔膜材料(诸如硝酸纤维素等)。更特别地,固相载体可包含多孔横向流测定装置或形成多孔横向流测定装置的一部分,如上所述。替代性地,固相载体可包含微流体型测定或形成微流体型测定的一部分,其中将一根或多根固体窄孔毛细管用于沿测定装置输送液体。

[0058] 在优选的实施例中,可以使用护理点(PoC)测定装置执行本发明方法的全部或至少部分。PoC装置典型地具有以下特征:制造便宜,在单次使用后丢弃,通常是独立的,不需要任何其他设备或器材来执行测定或解读测定,并且理想地,不需要临床知识或培训便可使用。

[0059] 本文披露了适用于本发明的引物的实例。可以适用于本发明方法的其他实例尤其披露于US 2009/0017453和EP 2,181,196中,两者的内容通过援引并入本文。本领域技术人员将能够容易地设计适合于扩增其他靶标序列的其他引物而无需过多的实验。

[0060] 如别处所解释的,本发明中使用的引物将优选地不仅包含靶标互补部分,还包含切口核酸内切酶结合位点和切口位点,以及稳定部分。优选的引物可含有自身互补序列,该序列可在引物分子中形成茎-环结构。

[0061] 用于本发明方法的引物可包含经修饰的核苷酸(即,在天然存在的核酸分子中未发现的核苷酸)。此类经修饰的核苷酸可以方便地存在于引物的靶标互补部分和/或引物中的其他位置。经修饰的核苷酸的优选实例是2'-修饰的核苷酸,尤其是2'-O-甲基修饰的核苷酸,尽管许多其他经修饰的核苷酸是本领域技术人员已知的。

[0062] 温度分布

[0063] 本发明的方法虽然不是等温的,但不需要热循环。因此,本发明的方法不需要使用在PCR中用到的相对复杂的热循环设备,因而更容易应用于PoC环境。

[0064] “热循环”或温度循环意味着,特别地,反应混合物的温度保持在特定温度(即 t_1)特定的时长(典型地至少30秒)。然后调节温度(向上或向下),再返回到之前保持的温度。

[0065] 典型地,非等温核酸扩增反应(例如PCR)需要每个循环执行多个热步骤(即,至少两个或更多个),并且每个反应需要执行多个热循环。

[0066] 在温度降低的幅度高于预定的最小水平并且低于预定的最大水平的意义上,本发明的方法中的温度降低是有意的和受控的。另外,温度降低速率优选地在预定范围内。

[0067] 本发明方法中的初始步骤(a)涉及使靶标序列与引物在允许该引物与靶标杂交的条件下至少暂时性接触,该引物至少具有与靶标序列互补的部分。这可以被称为“起始”阶段。

[0068] 该步骤典型地在50℃至65℃范围内、优选地52℃至62℃范围内、更优选地54℃至62℃范围内、最优选地58℃至62℃范围内的温度下完成。包含靶标和引物的反应混合物可以在该温度下保持一段合适的时间。考虑到本披露的益处,本领域的技术人员可以确定最

佳温度和反应混合物保持在该温度的最佳时间段,并且这些方面可能受到诸如以下因素的影响:靶标序列的长度、引物的长度尤其是引物与靶标互补的那部分的长度、靶标:引物杂交体的G:C含量、反应混合物的pH和盐浓度。典型的初始温度保持时间可以在5秒至5分钟、优选10秒至3分钟的范围内。允许步骤(a)中的初始杂交事件的典型条件将是本领域技术人员已知的并且在所附实例中描述。

[0069] 对于起始阶段,58℃至62℃的温度范围是优选的。这被认为足够高以最小化引物二聚体的形成(并因此减少非特异性扩增的量),并且增加在靶标双链体中产生潜在“起始位点”的概率,同时足够低以允许至少一些引物分子与靶标杂交。

[0070] 随后的温度降低有助于稳定相对短的引物和延伸产物的杂交,而不是引物与原始靶标分子的杂交。进一步假设反应混合物的额外冷却促进检测探针与检测靶标的杂交。

[0071] 在该方法的步骤(b)-(d)中所述的扩增过程中,降低反应混合物的温度。这可以以受调节的方式进行,例如,使用温度调节器件根据预定的温度分布降低反应混合物的温度。温度降低可以在起始阶段(步骤a)之后立即开始。有利地,反应混合物的体积较小,从而降低反应混合物(和进行反应所处的反应容器或基底)的热容量。

[0072] 方便地,反应混合物的体积小于100μl、优选地小于50μl、更优选地小于25μl并且最优选地小于20μl。以这种方式,温度调节器件可以更准确和更迅速地调节反应混合物的温度。在合适的实施例中,温度调节器件可以非常简单(例如,风扇)或者可以完全省去,其中在很大程度上或完全地通过被动方式(例如通过从反应混合物中的热辐射)实现充分冷却。通常,反应混合物体积可以在1μl至50μl、优选地1μl至20μl并且更优选地1μl至10μl的范围内。

[0073] 反应混合物体积可小于10μl。特别地,本发明的方法可采用“数字PCR”型方法(参见Morley 2014Biomolecular Detection and Quantification_{1,1-2}(Morley,2014年,《生物分子检测和定量》,第1卷,第1-2页)的综述),其中将样品稀释并分成许多(通常几百、几千、或甚至百万)个平行处理的等分试样:一些等分试样将包含靶标序列而一些不会:如果不存在靶标序列,则不产生信号。阴性等分试样的比例可用于推断原始样品中靶标序列的数量和/或浓度。在此类实施例中,每个等分试样中的反应混合物体积可以非常小,但典型地,最小体积将为2500nl,优选地至少50μl。

[0074] 可以以任何期望的分布降低温度。例如,温度可以根据基本上线性的分布(即,具有基本上恒定的温度降低速率)而降低,或者可以以任何非线性方式降低,包括以曲线或逐步方式,或以线性和非线性分布的任意组合(例如,一个或多个恒速温度降低周期与相对高速的温度降低周期交替,该恒速可以为零或相对低)。

[0075] 根据本发明的反应的温度分布使得不允许反应温度回到执行“起始”阶段所处的温度。因此,在本发明的方法中,与例如W02011/030145的披露内容相反,没有关于预定温度的振荡也不“返回”到预定温度。

[0076] 在扩增过程开始时反应混合物的温度将典型地与步骤(a)中的温度相同,例如优选地在54℃至62℃的范围内并且最优选地在58℃至62℃的范围内。在扩增过程中,温度降低至少2℃,优选地至少3℃、4℃或5℃,更优选地至少8℃、9℃或10℃,并且最优选地至少13℃、14℃或15℃,尽管可以理解的是,优选的温度下降幅度(以绝对值计)可以至少部分地取决于扩增过程开始时选择的初始温度,其中较低的初始温度(例如,在45℃至55℃范围内)

可以决定较低的温度下降和/或较低的温度降低速率。典型地,在扩增过程中温度降低的最大幅度约为20℃,尽管可以理解的是,最大温度降低可能小于该值(例如,16℃、17℃、18℃或19℃)或大于该值(例如,25℃或30℃)。

[0077] 在优选的实施例中,在扩增过程中反应混合物的温度降低幅度可以在5℃至40℃的范围内,优选地在8℃至35℃的范围内,更优选地在8℃至30℃或甚至8℃至25℃的范围内,并且最优选地在8℃至20℃的范围内。在扩增过程开始时反应混合物的典型初始温度在50℃至62℃的范围内,优选地在54℃至62℃的范围内,更优选地在56℃至60℃的范围内,并且最优选地在58℃至60℃的范围内。

[0078] 在优选的实施例中,扩增过程中的温度降低(本发明的方法的步骤(b)-(d))包括范围为54℃至50℃、56℃至50℃或58℃至50℃、更优选地58℃至45℃、58℃至40℃或甚至60℃至40℃的降低。应当理解,扩增过程中的温度降低可以大于上面定义的所述范围。也就是说,最大温度可以超过所述范围的上限温度和/或最小温度可以低于所述范围的下限温度。

[0079] 优选选择扩增反应的最终温度与所选择的检测方法相容。例如,如果检测方法涉及使用酶标记,则可能希望将扩增反应的最终温度设置为与酶相容,并且例如在酶的最佳温度的±5℃以内。替代性地,在检测方法涉及使用杂交检测探针(例如分子信标等)的情况下,有利的是将待选择的扩增反应最终温度设置成与检测探针/检测靶标双链体的 T_m 相容。

[0080] 例如,最终温度可以方便地低于检测探针/检测靶标双链体的 T_m ,优选地低至少2℃,以便促进探针与检测靶标的杂交。

[0081] 扩增过程中典型的平均温度降低速率在 $-0.10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 至 $-6.0^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的范围内,优选地在 $-0.20^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 至 $-3.5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的范围内,更优选地在 $-0.30^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 至 $-3.5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的范围内,最优选地在 $-0.40^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 至 $-3.5^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 的范围内。从前述内容将显而易见的是,取决于温度降低梯度的性质,在扩增过程中任何一个瞬间的实际温度降低速率可能偏离优选的平均速率。

[0082] 在一些实施例中,温度降低梯度基本上是线性的,持续至少3分钟、更优选地至少4分钟并且最优选地在扩增过程的大部分持续时间内。通常,温度降低梯度在3至12分钟范围内、优选地4至10分钟范围内、最优选地4至8分钟范围内的时间段内基本上是线性的。出于本发明的目的,“基本上线性的”意味着,对于描述温度梯度的任何二阶多项式,X系数的大小小于Y系数的值的5%。

[0083] 可以设想大量不同的技术以在扩增过程中实现期望的温度降低。这些技术可包括以下一种或两种:(a) 停止向反应混合物施加热量和/或从加热和/或隔热环境中移走反应混合物,然后使反应混合物基本上通过向周围环境中的被动热损失而冷却;(b) 对反应混合物施加主动冷却。主动冷却可涉及将反应混合物暴露于冷却的环境,例如,使反应混合物与冷却的介质尤其是流体进行热连通(传导、辐射或对流)接触。这可以包括:例如,使反应混合物与冷水浴接触,使用风扇将冷空气或其他气体吹过反应混合物或通过反应混合物,使反应混合物和与反应混合物相容的冷却剂接触,该冷却剂可以是气体、液体或固体,或使用帕尔贴(Peltier)型冷却装置。例如,与反应混合物相容的冷却剂可以是冷冻或冷却液体形式的与反应混合物相容的缓冲剂。添加冷缓冲剂往往会稀释反应混合物,因此如果采用这种方法,则可能优选在远低于反应混合物温度的温度下(即,冷20℃以上)使用小体积(例如小于1μl至2μl)的冷却剂。

[0084] 可以在扩增过程中不连续地施加任何主动冷却步骤,以便实现期望的温度降低水平或/或期望的温度降低分布。特别地,主动冷却可以在扩增过程中以两个或更多个散布的间隔执行,并且可以任选地与被动冷却同时或交替地组合。

[0085] 通常,优选基本上通过纯被动的方式实现期望的温度降低量和速率,因为这简化了执行该方法所需的方法和任何设备或试剂盒。为了通过基本上纯被动的方式实现期望的冷却量和速率,希望反应混合物的体积较小,以便降低其热容量,如前所述。

[0086] 本发明方法的优选特征是扩增过程可以利用具有最佳温度的第一聚合酶和具有最佳温度的第二聚合酶,其中第二聚合酶的最佳温度低于第一聚合酶的最佳温度。因此,第一聚合酶可以在扩增过程开始附近特别有活性,因为反应混合物的温度可以处于或接近第一聚合酶的最佳温度。

[0087] 因此,例如,第一聚合酶可以有利地为“嗜热”酶(即,具有超过60℃的最佳温度)。

[0088] 相反,第二聚合酶具有低于第一聚合酶的最佳温度。随着扩增过程的继续,反应混合物的温度下降并更接近第二聚合酶的最佳温度。因此,第二聚合酶变得越来越有活性,这至少部分地补偿反应速率的下降,该下降归因于以下方面:(i)因较低温度导致的反应的一般热力学减慢,以及(ii)反应混合物的温度可能降低到第一聚合酶的最佳温度以下,从而导致催化作用减弱。

[0089] 有利地,第二聚合酶的最佳温度在30℃至55℃的范围内,更优选地在30℃至45℃的范围内。

[0090] 在一个具体实施例中,第二聚合酶可以是DNA聚合酶I的克列诺片段或Bsu聚合酶。

[0091] 可以想到,甚至可以使用第三种或进一步的聚合酶,该聚合酶优选具有更低的第三最佳温度。

[0092] 第二聚合酶优选在扩增过程开始时就处于反应混合物中,但是如果需要,可以在一定的延迟后添加第二聚合酶,从而使反应混合物的温度从高的初始温度降低。例如,如果第二聚合酶特别是不耐热并且如果在扩增过程开始时通常采用的相对高的温度下存在则可能实质性变性,则这可能是有利的。

[0093] 以与前述内容高度类似的方式,扩增过程可以利用分别具有较高和较低最佳温度的第一切口酶和第二切口酶。根据具体情况,第一切口酶和第二切口酶可以与单一聚合酶或多种聚合酶结合使用。

[0094] 如上所述,使用具有较低最佳温度的第二切口酶可以至少部分地抵消在扩增过程中温度下降时预期的反应速率降低。

[0095] 因此,在一些实施例中,反应混合物的温度可以始于、或者可以在扩增过程中降低至低于第一聚合酶和/或第一切口酶的最佳温度的温度,并且倾向于接近甚至可以达到第二聚合酶和/或第二切口酶的最佳温度。

[0096] 方便地,在一些实施例中,本发明的方法可包括使反应混合物与降解核酸的降解酶接触的步骤。理想地,该步骤直到用户获得期望的扩增反应结果(例如检测病原体)才实现。因此,典型地,在扩增过程达到所需的终点后将降解酶加到反应混合物中。优选地,降解酶是不耐热的,以致于如果在扩增过程达到期望终点之前无意中将该降解酶引入反应混合物中或与反应混合物接触,则温度足以使该酶实质性变性或以其他方式失活。合适的实例包括可从ArcticZymes®获得的鳕鱼尿嘧啶-DNA糖基化酶(“UDG”)以及包括南极不耐热

UDG (可从新英格兰生物学实验室公司获得)。这些酶在分别暴露于55℃或50℃的温度时快速且不可逆地失活,并且与降解酶相关的术语“不耐热”应相应地解释。替代性地,可以使用热敏性降解酶(即,在50℃以下具有至少部分活性但在55℃以上可逆地实质性失活的酶)。

[0097] 现在将通过说明性实例并参考附图进一步描述本发明,在附图中:

[0098] 图1A至图1C是可用于执行本发明的方法的引物的典型实施例的示意图;

[0099] 图2A和图2B分别是适于执行本发明的方法的核酸扩增反应的起始阶段和指数扩增阶段的示意图;

[0100] 图3至图11是(扣除了背景的)荧光(任意单位)和温度(℃)对时间(分钟)的曲线图;

[0101] 图12A至图12C是扩增反应的各个重复实验的(扣除了背景的)荧光(任意单位)对时间的曲线图;

[0102] 图13是散点图,该散点图对在根据本发明的“STAR”条件下或在等温条件下从10个拷贝的模板序列实现扩增所花的时间进行比较;

[0103] 图14A和图14B是使用等温扩增条件(分别为63℃或49℃)的(扣除了背景的)荧光(任意单位)和温度(℃)对时间的曲线图;

[0104] 图15A、图15B和图15C是根据本发明在各种温度分布下的扩增反应的各个重复实验(10个拷贝或100个拷贝;分别为虚线和实线)的(扣除了背景的)荧光(任意单位)和温度(℃)对时间(分钟)的曲线图;

[0105] 图16A和图16B是根据本发明在不同温度分布下的扩增反应的(扣除了背景的)荧光(任意单位)和温度对时间(分钟)的曲线图;

[0106] 图17A和图17B是根据本发明使用含有6(图17A)或7(图17) O-甲基化碱基的引物执行的扩增反应的(扣除了背景的)荧光(任意单位)和温度(℃)对时间(分钟)的曲线图;以及

[0107] 图18是根据本发明使用通过单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) 23S RNA的逆转录所产生的DNA靶标执行的扩增反应的(扣除了背景的)荧光(任意单位)对时间(分钟)的曲线图。

[0108] 实例

[0109] 实例1:用于测试温度降低的方案

[0110] 通过对随着时间的推移温度降低的扩增与使用标准等温条件的扩增进行比较,测试了温度降低对扩增反应的影响。温度降低扩增在本文中称为“STAR”(选择性温度扩增反应)。除非另有说明,否则使用如下所述的方案进行这些比较。

[0111] 酶、寡核苷酸和靶标

[0112] 将沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)用作开发STAR机制的初始靶标。沙眼衣原体血清型J(ATCC VR-886)基因组DNA获自弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection(Manassas, VA))。用引物STARctF61a(SEQ ID NO:1, 5'-CGACTCCATATGGAGTCGATTCCCCGAATTA-3')和STARctR61c(SEQ ID NO:2, 5'-GGAC TCCACACGGAGTCTTTTTCCTTGTTTAC-3')扩增隐蔽质粒的开放阅读框6区。如EP No.0728218中所述,使用分子信标STARctMB1(SEQ ID NO:3, 5'-FAM/ccattCCTTGTTTACTCGTATTTTAGGaa tgg/BHQ1-3')检测所得的DNA模板。Manta 1.0 DNA聚合酶购自马萨诸塞州贝弗利的酶科技公司(Enzymatics(Beverly, MA))。Nt.BstNBI切口核酸内切酶购自马萨诸塞州伊普斯威奇

(Ipswich, MA) 的新英格兰生物学实验室公司, 描述于美国专利号 6,191,267 中。

[0113] 寡核苷酸和分子信标由爱荷华州克拉尔维尔的集成DNA技术公司 (Integrated DNA Technologies (Coralville, IA)) 和德克萨斯州刘易斯维尔的生物合成公司 (Bio-Synthesis (Lewisville, TX)) 合成。STAR 反应中使用的引物的一般特征如下:

[0114] 构建引物组, 所述引物组具有切口位点的 5' 的稳定区和切口位点的 3' 的靶标特异性结合区 (图 1A)。以这样的方式构建引物: 通过产生形成至少一部分茎的自身互补结构, 可以在寡核苷酸的 5' 末端形成茎和环结构。选择该结构的 T_m 以指导线性或指数扩增, 具体取决于给定时间下的反应温度。茎进一步包含切口酶识别序列的至少一部分。引物中的切口酶识别序列是双链茎结构的一部分, 但至少一个核苷酸是单链的以防止产生切口。如果需要, 与靶标序列互补的序列可以包含二级结构或可以不含二级结构。此外, 该序列可以包含经修饰的核苷酸, 诸如 2' 修饰或硫代磷酸酯键。

[0115] 参见图 1A, “引物区” 是与靶标序列互补并与靶标序列退火的序列。“NEB 区” 是切口核酸内切酶结合区, 即切口酶的识别区, 在这种情况下, 该切口酶在 NEB 区末端下游四个核苷酸的位点处使引物产生切口。“扩增环” 为扩增过程提供引物稳定化和杂交, 并且在起始阶段通过自身互补作用而自身成环以减少背景非特异性扩增。图 1B 和图 1C 显示了可用在本发明的方法中的引物的略微不同的实施例。引物结构基本上与图 1A 中所示的实施例相同, 但改变的引物在“引物区” 中包含经修饰的碱基。具体地讲, 在引物区的 3' 末端, 有一串连续的 2'-O-甲基化碱基。在图 1B 中, 该串的长度为 7 个碱基, 而在图 1C 中, 该串的长度为 6 个碱基。图 1B 和图 1C 中所示种类的引物用于下面的实例 8 中。

[0116] 在反应中发现的寡核苷酸和扩增机制的概述包括: (1) 靶标核酸分子; (2) 两种或更多种引物寡核苷酸分子, 这些分子包含一些数量的与靶标核酸分子互补的寡核苷酸; 以及 (3) 引物内可被切口酶产生切口的位点。该方法涉及使靶标核酸分子与聚合酶、两种或更多种引物寡核苷酸 (其中每一种都与靶标核苷酸分子上的互补序列特异性结合) 和切口酶接触; 以及, 在非等温条件下, 产生可检测的扩增子, 该扩增子包含引物寡核苷酸的结合靶标序列的至少一部分。整个 STAR 反应可以被理解为经历两个不同的阶段; 即起始和指数扩增。起始阶段是可以发生指数扩增的指数-模板双链体的初步形成。这两个阶段在图 2A 和图 2B 中示意性地示出。在这些图中, 三角形符号代表切口酶, 而六角形符号代表 DNA 聚合酶。引物与靶标核酸的初始接触发生后是延伸并产生正向起始模板。然后, 相反链引物与新产生的正向起始模板结合, 从而在朝向并通过起始模板的切口位点的方向上延伸。该初始过程可以被理解为涉及将聚合酶用于延伸并且非常易于形成引物二聚体和错误扩增截短的产物或背景产物。一旦在任一条链上开始产生切口, 聚合酶就将渗入切口位点并向相反的引物延伸且穿过切口位点。

[0117] 一旦在正向起始链和反向起始链两者上发生这种产生切口随后是聚合酶延伸的循环, 就形成称为指数双链体的双链体。第二反应阶段开始; 这个指数扩增过程自我供给, 因为从切口和延伸产生的每个新模板现在是另一个引物的靶标。

[0118] 现在可以理解, 第二阶段需要活性切口核酸内切酶以快速生成模板。先前已知的是, 这种切口链置换复制排除了对温度循环的需要, 因此反应可以并且一直在恒定温度下进行。本发明的新发现允许实现独特且不同的扩增方法, 这些扩增方法具有比现有方法显著更高的性能, 包括在短时间内大量产生具有高特异性的产物。

[0119] 扩增条件

[0120] 基本的选择性温度扩增反应 (STAR) 混合物包含两种引物, 即聚合酶和切口酶 (上文提及的)。反应在 20 μ l 的最终体积中进行, 该体积包含 0.41 μ M 的正向引物、0.2 μ M 的反向引物、0.18 μ M 的分子信标、10 μ l 的 STAR 主混合物 (Master Mix) 和 5 μ l 的 DNA 样品。STAR 主混合物含有以下试剂: 15mM 的 MgSO_4 、90mM 的 Tris-HCl (pH 8.5)、300 μ M 的各种 dNTP、15mM 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、15mM 的 Na_2SO_4 、1mM 的 DTT、0.01% 的 Triton X-100、7U 的切口核酸内切酶、48U 的聚合酶。反应温度是等温的或基于温度降低的量而变化。如果每个反应中扩增期间的温度始于 60°C 并且每 15 秒或 1 分钟降低指定的量, 则例如负 0.5°C 速率 (即, 每 15 秒温度降低 0.5°C) 持续 10 分钟将导致在反应过程中温度从 60°C 降至 40°C。使用 Agilent Mx3005 P QPCR 设备 (安捷伦公司 (Agilent)) 执行扩增和 STAR 产物检测。下表列出了所测试的温度分布, 除非另有说明:

[0121] 表1

[0122]	等温条件			
	预反应温育	开始	温度降低	结束
	60°C	60°C	无	60°C
	56°C	56°C	无	56°C
	50°C	50°C	无	50°C
	STAR 条件			
	预反应温育	开始	温度降低	结束
	60°C	60°C	-0.1°C 每 15 秒	56°C
	60°C	60°C	-0.2°C 每 15 秒	52°C
	60°C	60°C	-0.5°C 每 15 秒	40°C
	60°C	60°C	-0.8°C 每 15 秒	32°C
	60°C	60°C	-1.0°C 每 15 秒	20°C
	60°C	60°C	-1.0°C 每分钟	51°C

[0123] 预反应温育是为了使试剂达到一定温度以测试降低温度对扩增动力学、酶性能和信号荧光的影响。以这种方式进行反应消除了增加的温度变量, 并允许在现有的等温扩增技术与新的 STAR 方法之间进行直接比较。

[0124] 扩增程序

[0125] 执行扩增反应的确切步骤如下: 1) 制备主混合物; 2) 制备具有靶标或无靶标的引物; 3) 将引物混合物添加到 96 孔板的 A-G 排中, 具体取决于每块板要进行的反应次数; 4) 将主混合物添加到同一 96 孔板的 H 排中; 5) 密封板并进行 2 分钟的预反应温育; 6) 将主混合物从 H 排转移到每个引物混合物排, 在转移之间等待 15 秒; 7) 密封并启动预选的温度分布和数据收集。

[0126] 在反应过程中, 通过使用如上所述的分子信标每 15 秒测量扩增产物。监测反应混合物中分子信标的荧光, 以测量反应期间产生的特定产物的量。在反应期间产生的特定产物与分子信标结合, 从而将荧光团与淬灭剂分开, 产生荧光。在扩增开始之前, 基于每个反应孔的前 3 个读数的平均值, 将荧光测量值扣除背景。基于从基线阈值水平 (TL) 的上升进行

进一步表征。TL的选择接近于扣除了背景的荧光的基线但高于随机波动的范围。温度的降低导致分子信标基线荧光由于茎强度增加而降低,从而导致恒定的线性基线降低,因为淬灭剂和荧光团具有更大的相互作用。选择2000的TL用于所有反应。为了进行比较,基于扩增达到TL的时间来确定确切的数,该数称为 A_T 值。使用 A_T 值允许对一块板与另一块板进行比较。

[0127] 实例2:使用未修饰的引物的结果

[0128] 为了证明STAR提供了优于当前等温技术的改进,使用针对靶标的18次重复实验和针对无靶标的6次重复实验进行了扩增。与等温条件相比,STAR反应显示出速度、灵敏度和总荧光的显著改进。特别是,-0.8℃分钟至-3.2℃分钟的范围明显优于所有等温条件(图3至图11)。令人惊讶和出乎意料的是,这种显著的温度下降仍然产生了优异的结果。在不将申请人限制于任何特定理论的情况下,据信,扩增的改进可归因于至少三个特征,这些特征在下文进一步讨论。

[0129] 使用未修饰的引物开展的实验的结果显示在图3至图11中。在这些图中,温度分布由背景阴影表示。深色图表示“非靶标”阴性对照的信号(荧光)量。在10个或100个拷贝的靶标(沙眼衣原体的基因组DNA)存在下产生的信号量由较浅的图表示。

[0130] 图3、图4和图5分别显示了在50℃、56℃和60℃下的等温扩增(即,不根据本发明的方法)的结果。如从图3中可以看出,在50℃下基本上没有特异性扩增;在56℃下存在强烈的扩增(图4),至少对于100的靶标拷贝数如此;以及在60℃下存在低扩增(图5)。

[0131] 图6至图10显示了根据本发明的非等温(STAR)扩增反应所获得的结果,其中在扩增期间温度降低。温度降低的速率是线性的,从图6中的-0.1℃每15秒(即,-0.4℃每分钟)到图10中的-1.0℃每15秒(即,-4.0℃每分钟)。可以看出,在所有情况下,与具有10个拷贝的靶标的反应相比,具有100个拷贝的靶标的反应产生了更多的荧光信号,正如预期的那样。更重要的是,这些反应比等效的等温扩增产生了多得多的信号,特别是对于10个靶标拷贝数的反应而言。此外,可检测信号比等效的等温反应更快地产生。

[0132] 当使用非线性、逐步温度降低(如图11所示)执行本发明的方法时,获得了类似的结果。

[0133] 本发明人还发现(为简洁起见省略了数据),STAR反应中不同重复实验之间的信号量的变化远低于等温反应中各重复实验之间的信号变化,证明了本发明的方法产生了一致得多的结果。以下评论提供了一种可能的机制,通过该机制,本发明的方法可以赋予上述优点。

[0134] 在大多数核酸扩增反应中,最终形成引物二聚体,从而竞争有限的试剂,并且在低靶标浓度下,引物二聚体可能变成反应的主要扩增途径。限制或延迟引物二聚体的形成,即使是少量限制,也为反应提供了显著的益处。由于扩增反应的快速性质,延迟引物二聚体的形成允许优选的扩增途径占优势(即模板产生),从而改进扩增的所有方面。通过在升高的温度下引发反应,这些模板途径变得占优势,甚至是优选的。这可以通过STAR方法中改进的灵敏度、改进的荧光信号、各重复实验更紧密地成组(即,更高的再现性)和提高的速度而看出。

[0135] 在反应的起始阶段之后,指数阶段开始。由于模板途径优于错误途径,因此希望尽可能快地产生尽可能多的产物,并且这由STAR促进。这种产生所面临的最有可能的限制性

步骤之一是通过切口核酸内切酶使位点产生切口。随着反应混合物的温度降低,该温度接近切口核酸内切酶的最有利温度,并且反应效率增加,从而产生尽可能多的用于检测的模板。

[0136] 随着温度进一步降低,分子信标有利于模板检测并降低荧光背景。模板与分子信标的解链温度变得显著高于检测温度,从而产生改进的信号,因为较少的模板从分子信标解链。此外,由于温度降低,茎解链温度变得高于反应温度。因此,当不存在模板时,分子信标有利于闭合阶段,从而产生较少的背景信号。

[0137] 本发明的新型非等温反应方法相对于现有的等温和热循环条件提供了实质性的改进。通过有利于酶活性和最佳反应动力学,该方法改进了AT的变化、增加了产生的荧光总量、提高了扩增的一致性并增加了检测的灵敏度。

[0138] 实例3:使用SYBR Green II的结果

[0139] 因为分子信标仅测量特定单链DNA产物的总量的增加,所以不能独立于预期的扩增产物测量非特异性扩增产物。为了测量非特异性扩增产物的产生(例如由引物二聚体的形成引起),在SYBR Green II的存在下进行了单独的反应。SYBR Green II是已知用于检测单链DNA、RNA和双链DNA的最灵敏的染料之一。因为SYBR Green II具有低固有荧光,所以如果在没有靶标的情况下进行扩增,则它是检测反应中的总扩增或检测非特异性扩增的自然之选。反应直接在两种条件即等温和非等温(STAR)下进行,如下表2所示。

[0140] 表2

[0141]

等温条件			
预温育	开始	温度降低	结束
56°C	56°C	无	56°C
STAR 条件			
预温育	开始	温度降低	结束
60°C	60°C	-1.0°C 每分钟	51°C

[0142] 此外,这些反应将50个拷贝的基因组DNA相比无靶标进行了比较。SYBR Green II以10,000x浓度获得,每次反应使用0.5x(卡尔斯巴德的生命科技公司(Life Technologies, Carlsbad))。由于嵌入染料的固有性质,使用更高的TL即9000来计算 A_T 。SYBR Green II具有荧光与温度的反比关系。温度越低,荧光信号越高,如“Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature”(Gudnason et al., 2007 Nucl. Acids Res. 35 (19) e 127) (“用于实时PCR的多种DNA染料的比较:染料浓度和序列组成对DNA扩增及解链温度的影响”, Gudnason等人, 2007年,《核酸研究》,第35卷第19期,第e 127页)中所述。结果如下表3所示。

[0143] 表3

[0144]

SYBR Green II 反应		
等温条件		
靶标	平均 A _T (分钟)	靶标与无靶标扩增之间的差异
50 个拷贝的 gDNA	3.75	0.25
无靶标	4	
STAR 条件		
靶标	平均 AT (分钟)	
50 个拷贝的 gDNA	3	1
无靶标	4	

[0145] STAR方法表现出多种改进;首先,它减少了背景产生,这通过“无靶标”显示出SYBR Green II扩增所花的时间相对于靶标信号更长所证明。其次,它具有改进的产物扩增,如通过存在靶标时更快的扩增时间所看出。结合起来,这些改进使 A_T 相对于等温方法之间的差异超过四倍。

[0146] 应当注意,等温反应的 A_T 值比STAR的 A_T 值具有更大的变异性。这显示了新方法在控制扩增过程中的益处并且反映了使用传统方法的非特异性扩增途径的不可预测性。

[0147] 实例4:使用2'-O-甲基修饰的引物的结果

[0148] 如美国专利6,794,142和6,130,038中所述,已知使用2'-O-甲基修饰的引物可减少扩增期间引物二聚体的形成。US 2005-0059003描述了位于SDA引物的3'的2'-O-甲基修饰的用途,因此Bst DNA聚合酶I和衍生物可以有效地利用2'-修饰的核糖核苷酸作为用于DNA合成的引物。包含一个或多个2'修饰的核苷酸(例如,2'-O-甲基、2'-甲氧基乙氧基、2'-氟代、2'-烯丙基、2'-O-[2(甲基氨基)-2-氧乙基]、2'-羟基(RNA)、4'-硫代、4'-CH₃-O-2'-桥、4'-(CH₃)₃-O-2'-桥、2'-LN A和2'-O-(N-甲基氨基甲酸酯2'-Suc-OH))的靶标特异性引物区应当改进等温反应。如果2'修饰的核苷酸完全消除了引物二聚体的形成,那么STAR方法可以进一步改进扩增将是令人惊讶的。反应直接在两种条件即等温和非等温(STAR)下进行,如下所示。

[0149] 表4

[0150]

等温条件			
预温育	开始	温度降低	结束
56°C	56°C	无	56°C
STAR 条件			
预温育	开始	温度降低	结束
60°C	60°C	-1.0°C 每分钟	51°C

[0151] 使用引物3'末端上的2'修饰核苷酸进行的扩增的结果如下表5所示。在无靶标反应中,反应重复最少六次,在靶标反应中重复十二次。

[0152] 表5

[0153]

SYBR Green II 反应 2'O-甲基修饰		
等温条件		
靶标	平均 A _T (分钟)	靶标与无靶标扩增之间的差异
50 个拷贝的 gDNA	5	0.5
无靶标	5.75	
STAR 条件		
靶标	平均 A _T (分钟)	
50 个拷贝的 gDNA	4	1.5
无靶标	5.5	

[0153] 数据表明,使用至少一种掺入有2'O-甲基核苷酸的引物延迟了引物二聚体的形成,从而改进了反应,尽管使之减慢。此外,使用STAR方法不仅改进了2'O-甲基扩增的使用,从而恢复了一些丢失的速度,而且还将靶标与无靶标扩增之间的差异提高了三倍。这表明尽管2'O-甲基修饰确实减少了非特异性、错误扩增的产生,但它们并没有消除这种扩增。该数据进一步表明STAR方法比先前披露的现有技术更好地利用2'O-甲基修饰所产生的改进。

[0155] 在不将本发明限制于任何特定理论的情况下,假设通过在引物区中使用一个或多个2'修饰的核苷酸获得的潜在改进主要归因于扩增起始阶段的增强。

[0156] 在靶标上的引物区的初始延伸期间,在STAR的引物区中掺入一个或多个2'修饰的核苷酸导致这些核苷酸不适合作为通过引物的相互作用形成的非特异性复合物中聚合酶延伸的模板,从而减少背景信号。当核苷酸进入结合袋时,聚合酶很可能停滞。在非生产性反应(即,脱靶或引物二聚体形成)中,停滞效应足以使异常延伸最小化,因为模板结合接近其解链温度。因此,2'修饰能够限制不希望的扩增途径,因为反应已经陷入困境。然而,在有利的扩增期间,2'修饰降低了解链温度,从而对扩增产生负面影响,减慢了扩增时间。STAR能够利用2'修饰,同时最大限度地减少负面靶标扩增缺点。

[0157] 这种聚合酶停滞进一步解释了为什么STAR与2'O-甲基修饰相结合可相互促进。除了自然还原引物二聚体之外,STAR方法中发现的最初温度升高还加剧在可能发生错误扩增之前的2'修饰停滞和引物解链,因此两种方法相互补充。此外,由于STAR涉及降低温度,因此随着反应的进行,引物中2'修饰引起的解链温度的降低可以最小化。

[0158] 实例5:使用多种聚合酶的结果

[0159] 现有的扩增技术要么是热循环,要么是在恒温下运行。本发明的方法不采用任一种,而是通过降低温度且不循环来进行。本发明的特别新颖的特征是能够使用功能相似但具有不同的最佳温度值的酶。例如,该技术将允许使用被设计成用于在不同最佳温度值下起作用的切口核酸内切酶的多种引物,以及具有不同最佳值的不同链置换聚合酶。在不将本发明限制于任何特定理论的情况下,该方法开辟了快速扩增方法,从而允许采用在现有技术中未见到的酶和引物的新组合。下面的反应(表6)直接在三种条件即等温、非等温(STAR)和非等温(STAR)加BSU聚合酶(除了最初的Manta 1.0聚合酶外)下进行,如下所示。BSU聚合酶购自马萨诸塞州伊普斯威奇的新英格兰生物学实验室公司并以每次反应0.5U运行。使用18次靶标重复实验和6次无靶标重复实验运行所有条件。

[0160] 表6

[0161]	等温条件			
	预温育	开始	温度降低	结束
	56°C	56°C	无	56°C
	STAR 条件			
	预温育	开始	温度降低	结束
	60°C	60°C	-0.5°C 每 15 秒	40°C
	STAR 条件 + BSU 聚合酶			
	预温育	开始	温度降低	结束
	60°C	60°C	-0.5°C 每 15 秒	40°C

[0162] 使用含有10个拷贝的沙眼衣原体基因组DNA的样品进行了扩增反应,并且结果显示在图12A至图12C中。

[0163] 图12A显示了等温反应的结果(不是根据本发明)。图12B显示了单独存在Manta聚合酶时STAR反应的结果,而图12C显示了在另外的BSU聚合酶存在下STAR反应的结果。

[0164] 第一个明显的差异是通过等温方法未能充分检测10个拷贝的基因组DNA,18次重复实验中仅有9次超过荧光阈值水平(TL)并且可以说已经扩增。两种STAR方法均检测到18次重复实验中的17次。(应该注意的是,每种STAR方法中未检测到的重复实验是由于多通道移液器的故障所致)。

[0165] 虽然STAR方法之间的差异不太明显,但添加具有较低最佳温度(37°C)的第二聚合酶在10分钟后改进了总荧光。此外,第二聚合酶也收紧了各重复,从而降低了AT变异性。如果在市场上可以获得最佳温度值为45°C至50°C的商业链置换聚合酶,则可以进一步证明这种差异。结果表明STAR方法优于等温条件,并且进一步表明该技术允许新的机制、酶组合和引物扩增方案。

[0166] 实例6:再现性

[0167] 为了验证STAR技术的一致性,进行了大型重复研究,该研究对STAR和如美国专利9,562,263中所述的已公布的等温条件进行比较。对于包含靶标的反应使用100次以上的重复实验,对于不含靶标的对照反应混合物使用16次重复实验,进行了扩增(STAR相比等温)。两种条件都使用相同的缓冲剂、聚合酶、切口酶和靶标。如图13中的散点图所示,STAR技术显示出实现达到荧光阈值水平(TL)的扩增的平均时间(A_T)的明显改善、灵敏度的改进和各重复实验之间的标准偏差的降低。根据本发明进行的反应的 A_T 时间为3.35分钟,而根据常规等温方案进行的反应的 A_T 值为4.88分钟,如通过双尾t检验所判断,差异具有统计显著性。不将申请人限制于任何特定理论,扩增时间的显著缩短被认为是由于改进的反应引发(从而允许更有效的低拷贝扩增)、最小化的引物二聚体事件,并且增加的特异性产物延伸比以前披露的方法更快地产生模板。

[0168] 实例7:在常规等温温度范围之外进行的扩增反应

[0169] STAR技术的进一步益处是能够在最常见的等温扩增温度范围之外进行扩增。如美国专利5,712,124、9,562,263和5,399,391中所述,大多数等温扩增技术可以发生扩增的温度范围较窄。在这些典型的温度范围之外,传统的等温技术难以扩增。为了证明STAR的多能性,如下表7中所述进行了扩增。

[0170] 表7

等温条件			
预温育	开始	温度降低	结束
63°C	63°C	无	63°C
49°C	49°C	无	49°C
STAR 条件			
预温育	开始	第 1 次温度降低	第 1 次停止
62°C	62°C	-0.8°C 每 15 秒	32°C
63°C	63°C	-0.8°C 每 15 秒	33°C
64°C	64°C	-0.9°C 每 15 秒	28°C

[0171]

[0172]

两步 STAR 条件						
预温育	开始	第 1 次温度降低	第 1 次停止	下降立即重新开始	第 2 次温度降低	结束
63°C	63°C	-0.8°C 每 15 秒	60°C	49°C	-0.2°C 每 15 秒	42°C
一步 STAR 然后等温条件						
预温育	开始	第 1 次温度降低	第 1 次停止	下降立即重新开始	第 2 次温度降低	结束
63°C	63°C	-0.8°C 每 15 秒	60°C	49°C	无	49°C

[0173] 如美国专利9,562,263中所述进行等温反应。图14A和图14B是曲线图,显示了对于在63°C(图14A)或49°C(图14B)下进行的等温扩增反应,荧光信号的量(扣除了背景的;任意单位)对时间(分钟)的关系。在两幅图中,虚线图表示从没有模板的阴性对照反应获得的结果;实线图是得自含有模板的测试反应的结果。

[0174] 从图14A清楚可见,当反应温度保持在63°C时,基本上不发生模板特异性扩增。在图14B中,结果似乎表明在49°C下扩增从大约9分钟开始向前,但实际上这可能是由分子信标与引物的相互作用产生的错误信号(数据未显示)。

[0175] 与等温反应相反,根据本发明进行的“STAR”反应可以在升高的温度下引发并仍然实现良好的扩增。这些反应的结果显示在图15A、图15B和图15C中。这些是荧光(扣除了背景的,任意单位)对时间(分钟)的曲线图。实线阴影表示反应期间的温度(°C)。虚线图表示使用10个拷贝的靶标获得的结果,实线图表示使用100个拷贝的靶标获得的结果。在图15A中,初始温度为62°C,并且温度下降速率为-0.8°C每15秒(即,-3.2°C每分钟)。在图15B中,初始温度为63°C,并且温度下降速率为-0.8°C每15秒。在图15C中,初始温度为64°C,并且温度下降速率为-0.9°C每15秒(即,-3.6°C每分钟)。从图中显而易见的是,62°C或甚至63°C的初始温度对于STAR反应提供了良好的结果,并且使用64°C的初始温度甚至也存在一定的扩增,尽管这显然是次优的。

[0176] 此外,使用大的温度下降进行了实验。结果显示在图16A和图16B中。该图显示了无靶标阴性对照(没有高于阈值水平的荧光信号)和在10个或100个拷贝的靶标沙眼衣原体基因组DNA存在下进行的STAR反应的结果。

[0177] 图16A显示了如下获得的结果:使用63℃的初始温度,接着是-0.8℃每15秒的温度降低速率持续1分钟,然后突然降至49℃,再然后是在反应的持续时间中以-0.2℃每15秒(即-0.8℃每分钟)的逐渐温度降低。该曲线图显示了10个和100个拷贝数的反应都实现了扩增,尽管100个拷贝的靶标反应的荧光信号大约是10个拷贝的靶标反应的荧光信号的两倍,并且存在相当大的组内变异性。

[0178] 图16B显示了如下获得的结果:使用相同的63℃初始温度持续1分钟,然后突然降至49℃。之后,在实验持续时间中将反应温度保持在49℃。从曲线图中可以看出,存在良好的特异性扩增和少得多的组内变异(用100个拷贝数的靶标或无靶标进行的反应)。

[0179] STAR在40℃温度范围内扩增的能力清楚地表明STAR与常规的扩增反应大不相同。具有大范围的非典型反应温度是不寻常的,并且预期不会起作用。不将申请人限制于任何特定理论,出乎意料的是,这些大温度范围似乎对STAR的扩增的限制性低于常规扩增方法。可能的是,STAR在较大温度范围内实现优异扩增的能力是由于提高了引物特异性和结合以及策略性地利用酶最佳温度值。通过将较高的温度用于起始阶段,有利于真正的产物扩增,并因而提高所有后续阶段即指数扩增和检测的效率。这种选择和随后的温度下降打开了扩增工具箱,因为可以实现酶、引物和温度的新方案。

[0180] 实例8:使用六-和七-2'-O-甲基的结果

[0181] 如前所述,已知2'-O-甲基修饰的引物在扩增期间减少引物二聚体的形成。进一步证明这些修饰与STAR技术的协同性质是能够掺入大串2'-O-甲基修饰并仍然实现扩增。典型地,2'-O-甲基修饰使聚合酶停滞,从而永久地延迟扩增;据信,六个或更多个会导致聚合酶从复合物“脱落”而不仅仅是停滞。图17A和图17B证实了STAR能够耐受这些修饰并且使用比先前确定的更长的2'-O-甲基串实现显著扩增。含有2'-O-甲基化碱基的引物的结构如图1B和图1C所示。

[0182] 图17A和图17B是(扣除了背景的)荧光(任意单位)对时间(分钟)的曲线图。阴影表示在扩增反应过程中随时间推移的温度分布(℃)。图17A显示了使用含有6个2'-O-甲基修饰的碱基的引物进行的反应的结果,而图17B显示了使用7个2'-O-甲基修饰的碱基进行的反应的结果。在两种情况下,无靶标阴性对照反应未产生任何荧光信号,而使用任一种修饰引物都有良好的扩增,尽管带6个修饰碱基的引物的平均荧光信号略高,并且组内变异与带有7个修饰碱基的引物的结果相比显著降低。

[0183] 如图中所见,含有六个和七个2'-O-甲基的串的引物与STAR一起扩增良好。这可能是因为STAR能够在链置换聚合酶的65℃左右的高度有利的温度区域中开始扩增。该有利区域可以允许聚合酶延伸更长的2'修饰的串,从而实现其他技术所缺乏的引发。为简洁起见,未显示数据,但也可以说,引物区的整个长度已用2'-O-甲基修饰并显示扩增,尽管较慢且荧光信号较低。

[0184] 实例9:使用核糖核酸的结果

[0185] STAR可以使用DNA(cDNA和gDNA)、RNA(mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、微RNA)、RNA/DNA类似物、糖类似物、杂交体、聚酰胺核酸和其他已知类似物的任何组合从任何核酸扩增。如下

所述进行核糖体RNA的扩增。

[0186] 酶、寡核苷酸和靶标：

[0187] 将单核细胞增多性李斯特菌用作开发STARRNA测定法的靶标。单核细胞增多性李斯特菌(ATCC VR-886)基因组DNA获自弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心。对gDNA执行初步筛选,发现核糖体RNA的23S区将用引物LMONF72(SEQ ID NO:4,5'-GGACTCGATATCGAGTCCAGTTACGATTTGTTG-3')和LMONR86(SEQ ID NO:5,5'-gGACTCCATATGGAGTCCTACGGCTCCGCTTTT-3')扩增。如EP No.0728218中所述,使用分子信标LMONMB1(SEQ ID NO:6,5'-FAM/gctgcGTTCCAATTTCGCCTTTTTCGCagc/BHQ1-3')检测所得的DNA模板。使用RNeasy Plus微量提取试剂盒(德国希尔登(Hilden,Germany)的凯杰公司)与在Mini Bead Mill 4(VWR)上的快速机械裂解相结合来分离总RNA。单核细胞增多性李斯特菌(ATCC BAA-2660)获自弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心,并通过在脑心浸液琼脂平板(BHI)上铺板而复苏。使用单个菌落接种25mL BHI培养基,在37℃下生长18小时以达到稳定期。然后将培养物反稀释并且再生长四小时然后收获。将细菌沉淀重悬于RLT裂解缓冲液中,并在Mini Bead Mill (VWR)上匀化。根据制造商的说明(凯杰公司)纯化总RNA。通过使裂解物通过RNeasy Plus纯化试剂盒中提供的DNA结合柱除去基因组DNA。通过在RNeasy RNA结合柱上用柱上DNA酶I消化样品,进一步最小化基因组DNA污染。Bst X DNA聚合酶购自马萨诸塞州贝弗利的贝弗利凯杰公司。Omniscrypt是一种逆转录酶,购自德国希尔登的凯杰公司。Nt.BstNBI切口核酸内切酶购自马萨诸塞州伊普斯威奇的新英格兰生物学实验室公司,如美国专利号6,191,267中所述。寡核苷酸和分子信标由爱荷华州克拉尔维尔的集成DNA技术公司合成。

[0188] 扩增条件：

[0189] 基本的STAR混合物含有如上文实例1中所述的所有物质,另外还包含以下物质:4U的逆转录酶(上文提及的)和代替Manta 1.0的Bst.X。

[0190] 结果显示在图18中,该图是荧光(任意单位)对时间(分钟)的曲线图。阴影表示反应过程中的温度分布。阴性对照反应未产生任何荧光信号,而10、100或1000个拷贝数的靶标反应在缩短的时长(分别为约3.5分钟、3.0分钟和2.75分钟)内产生了高于阈值的荧光信号。结果表明,STAR可以有效地从逆转录的RNA靶标扩增。

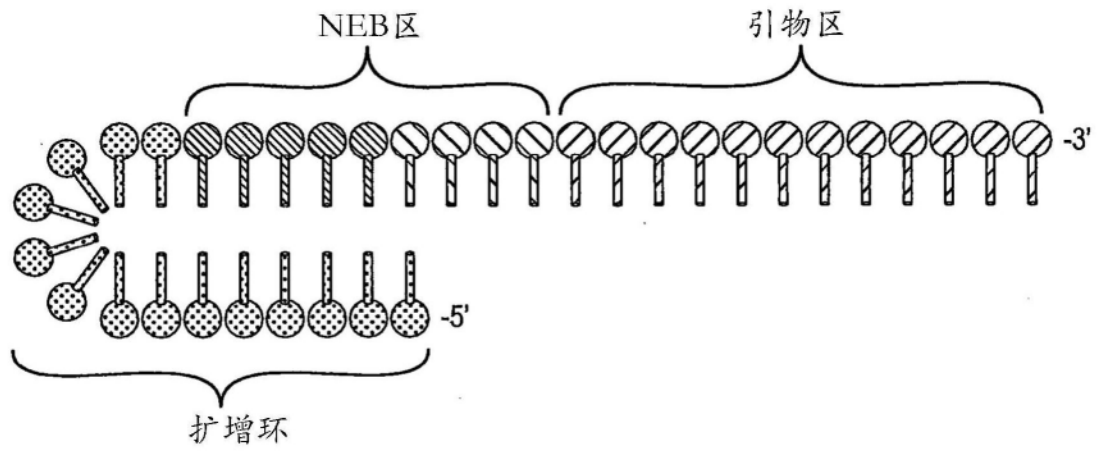


图1A

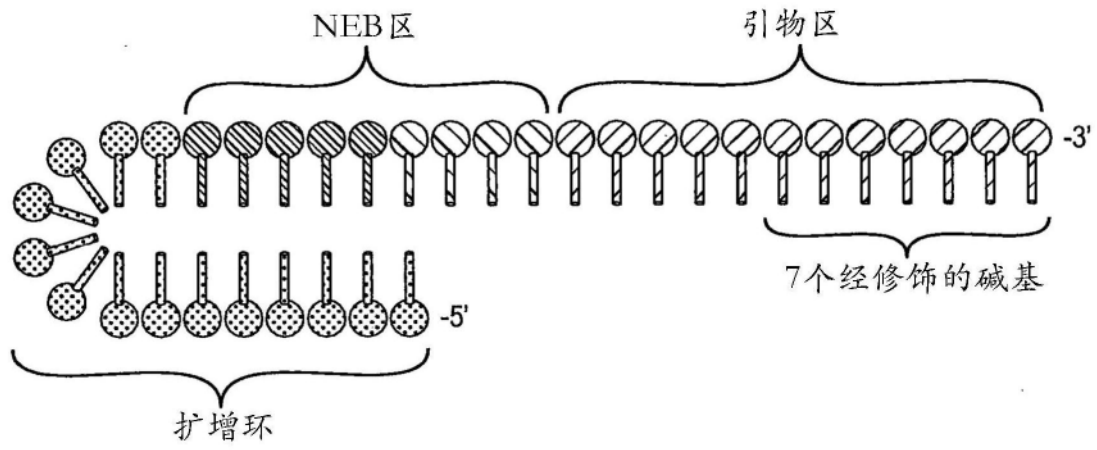


图1B

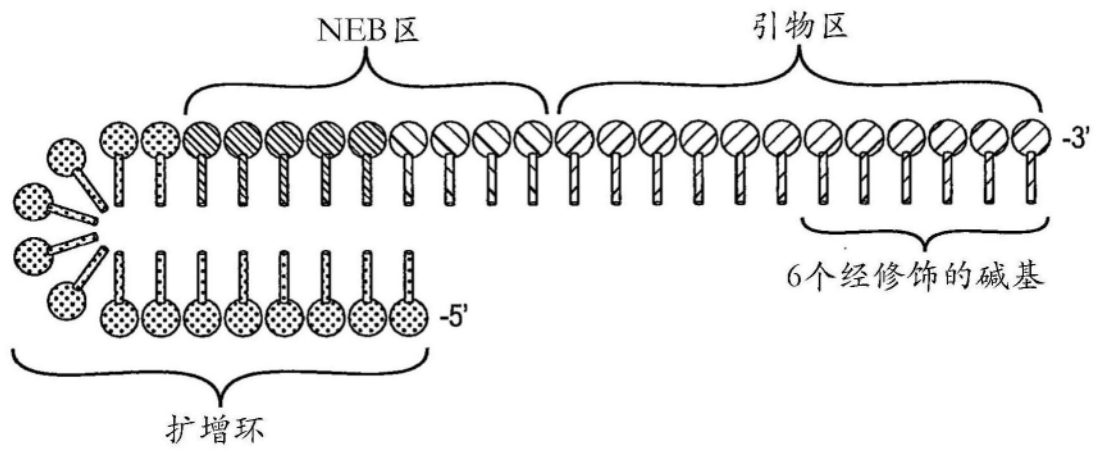


图1C

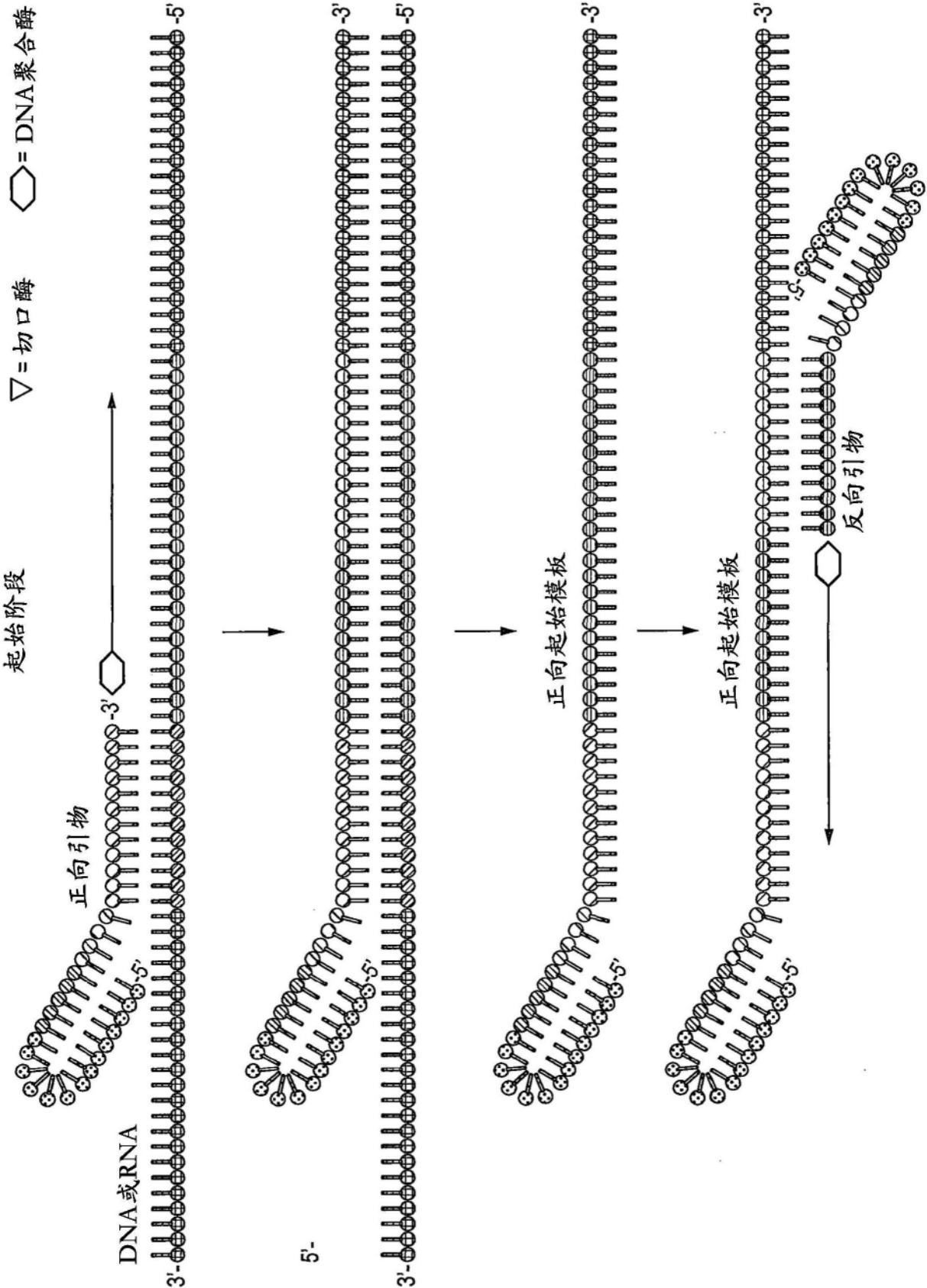


图2A

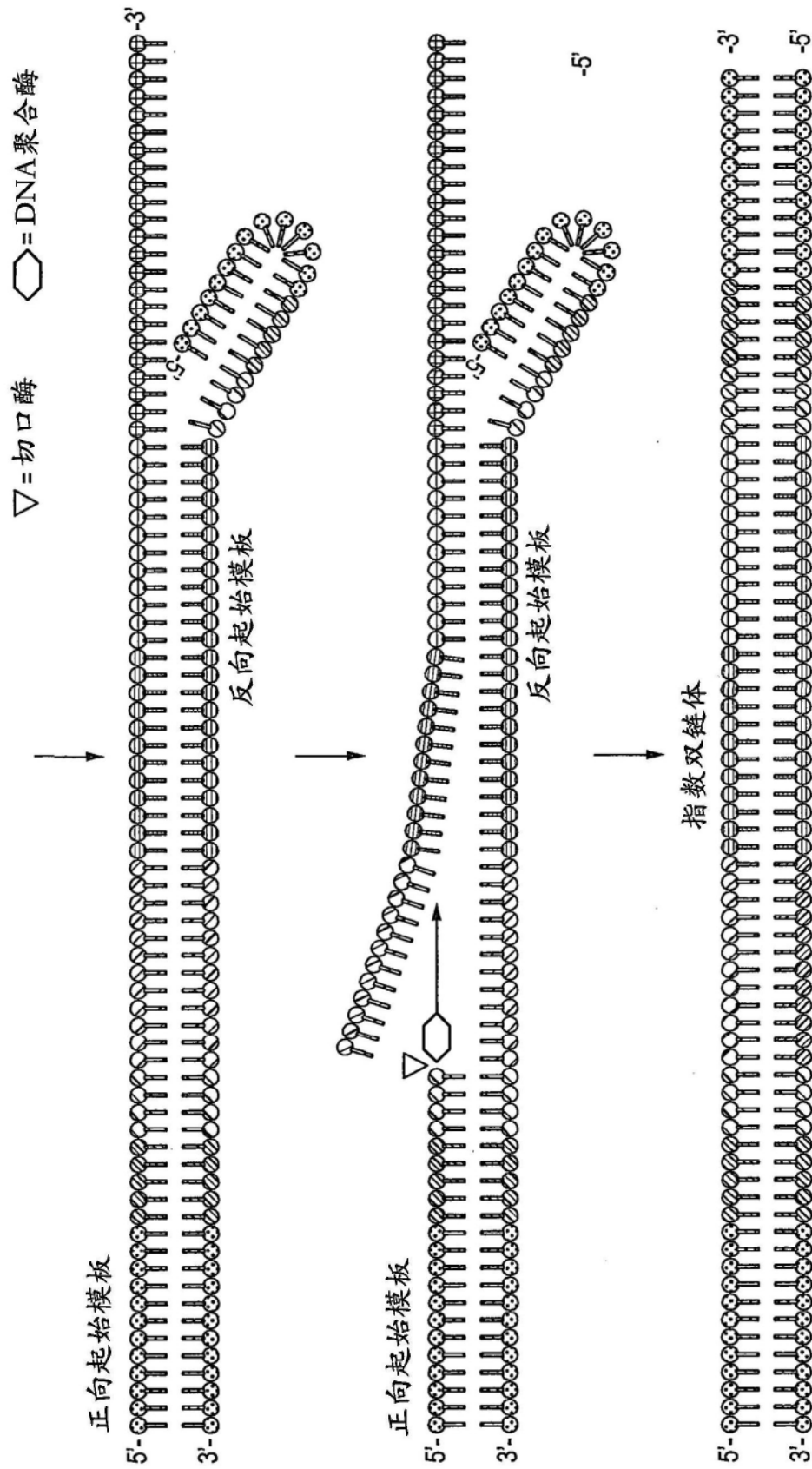


图2A(续)

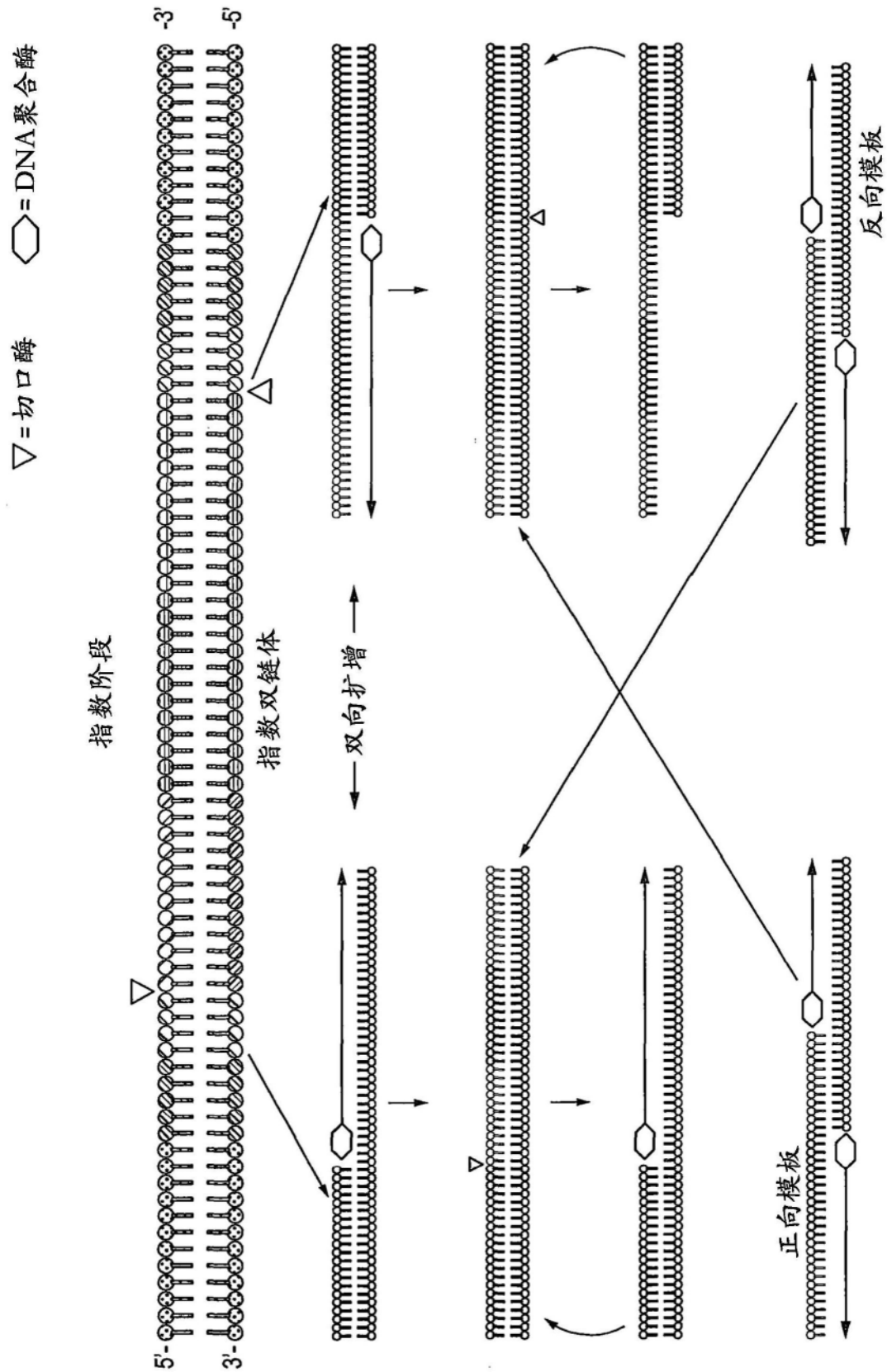


图2B

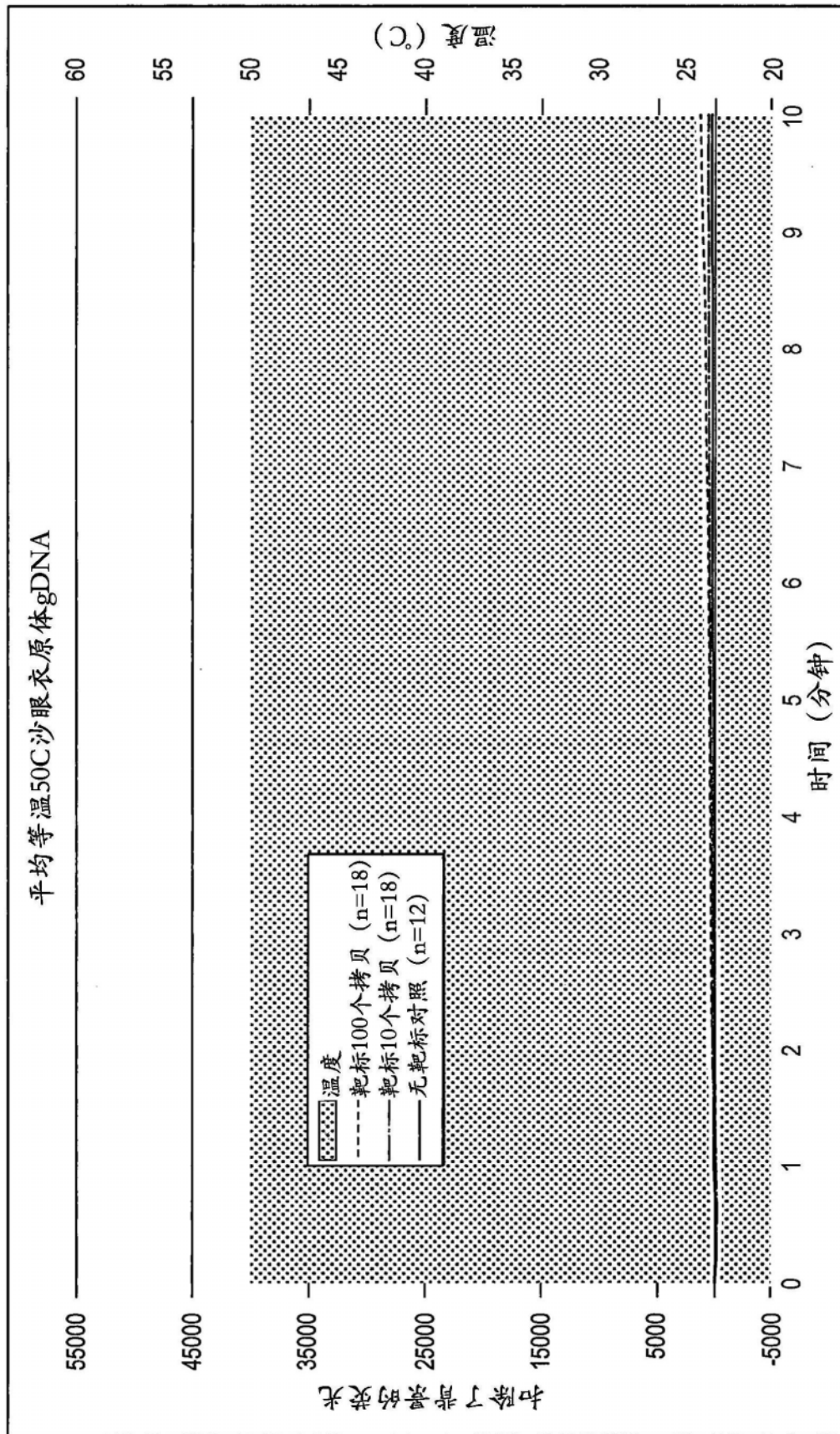


图3

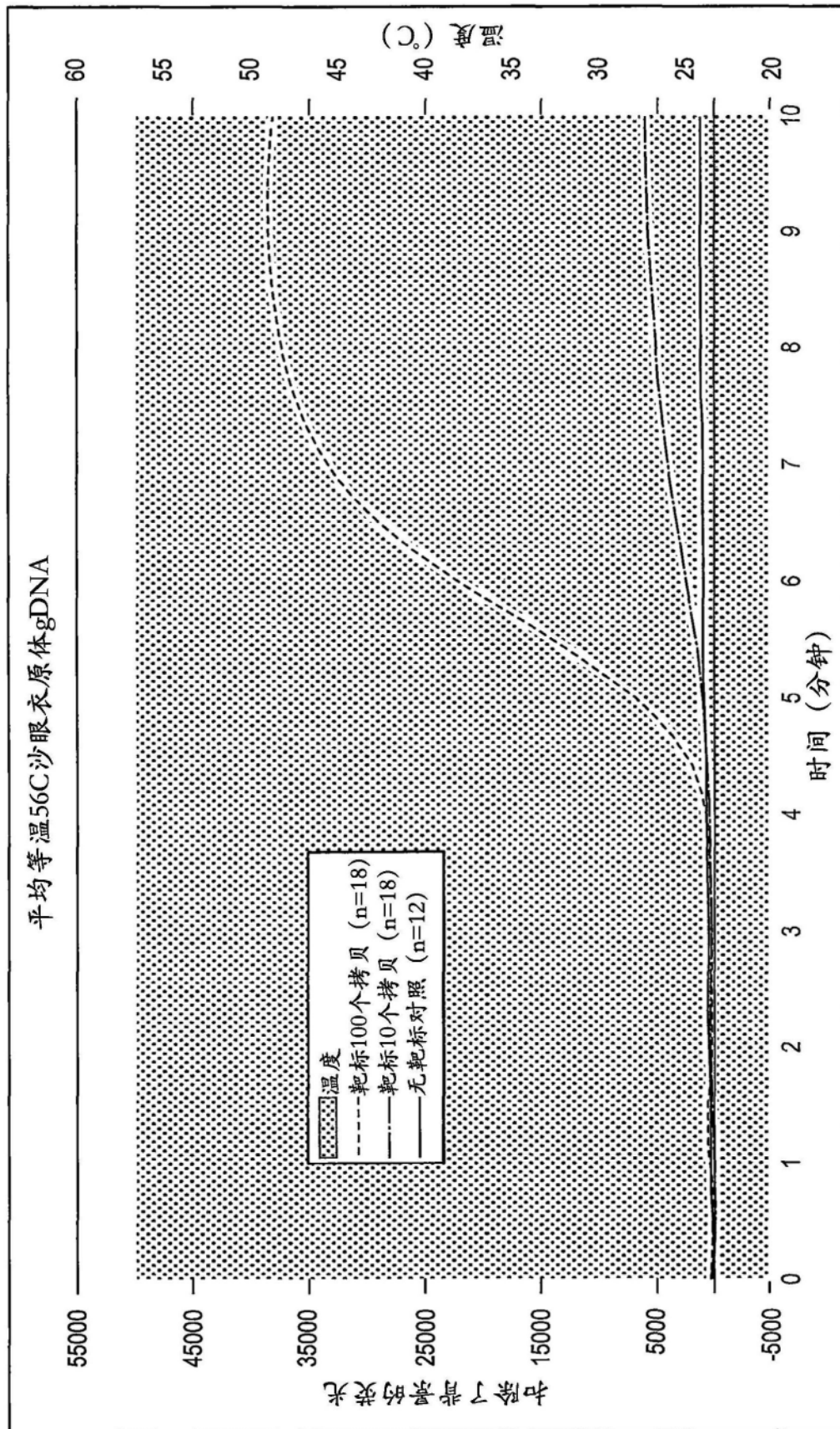


图4

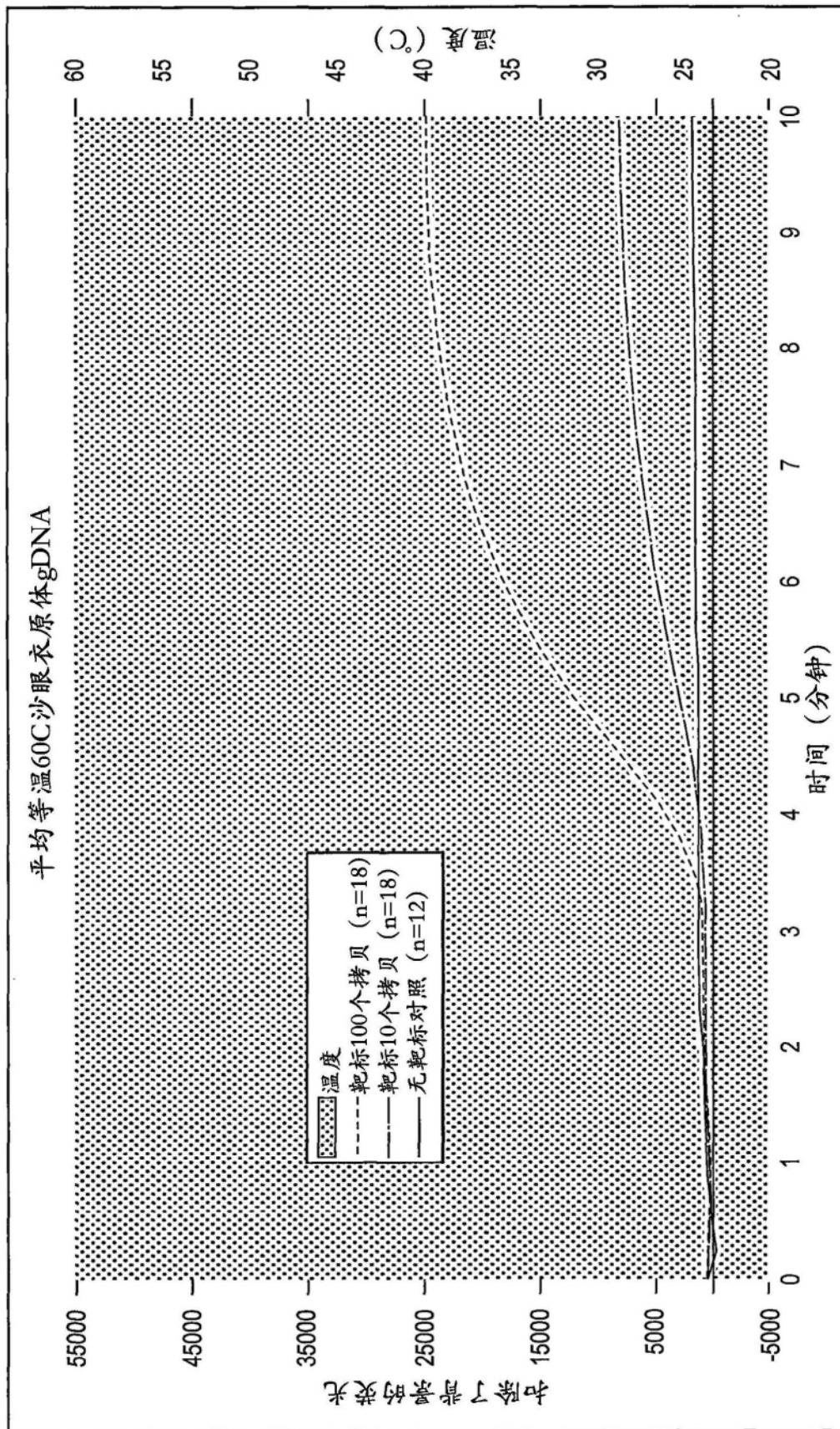


图5

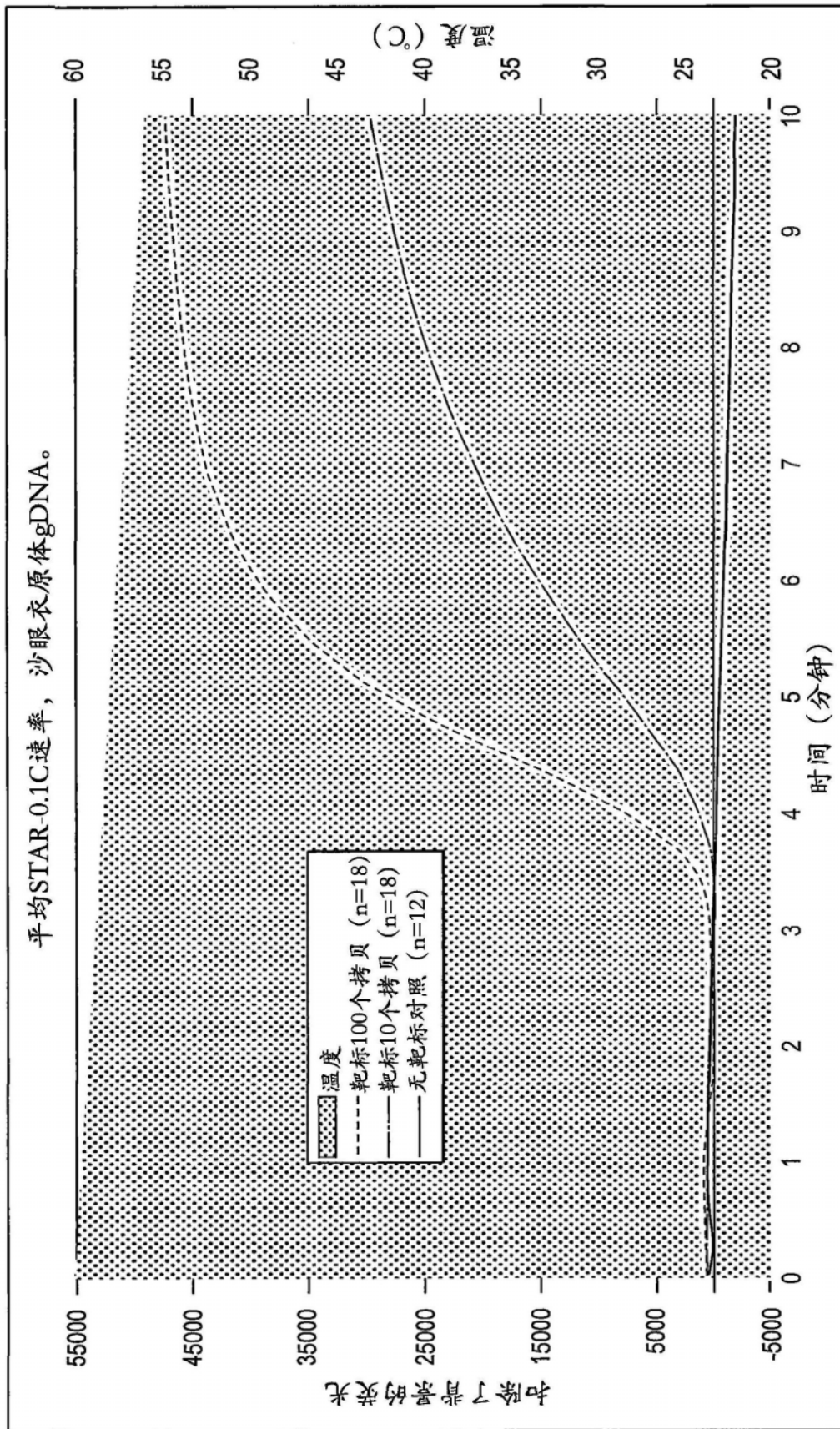


图6

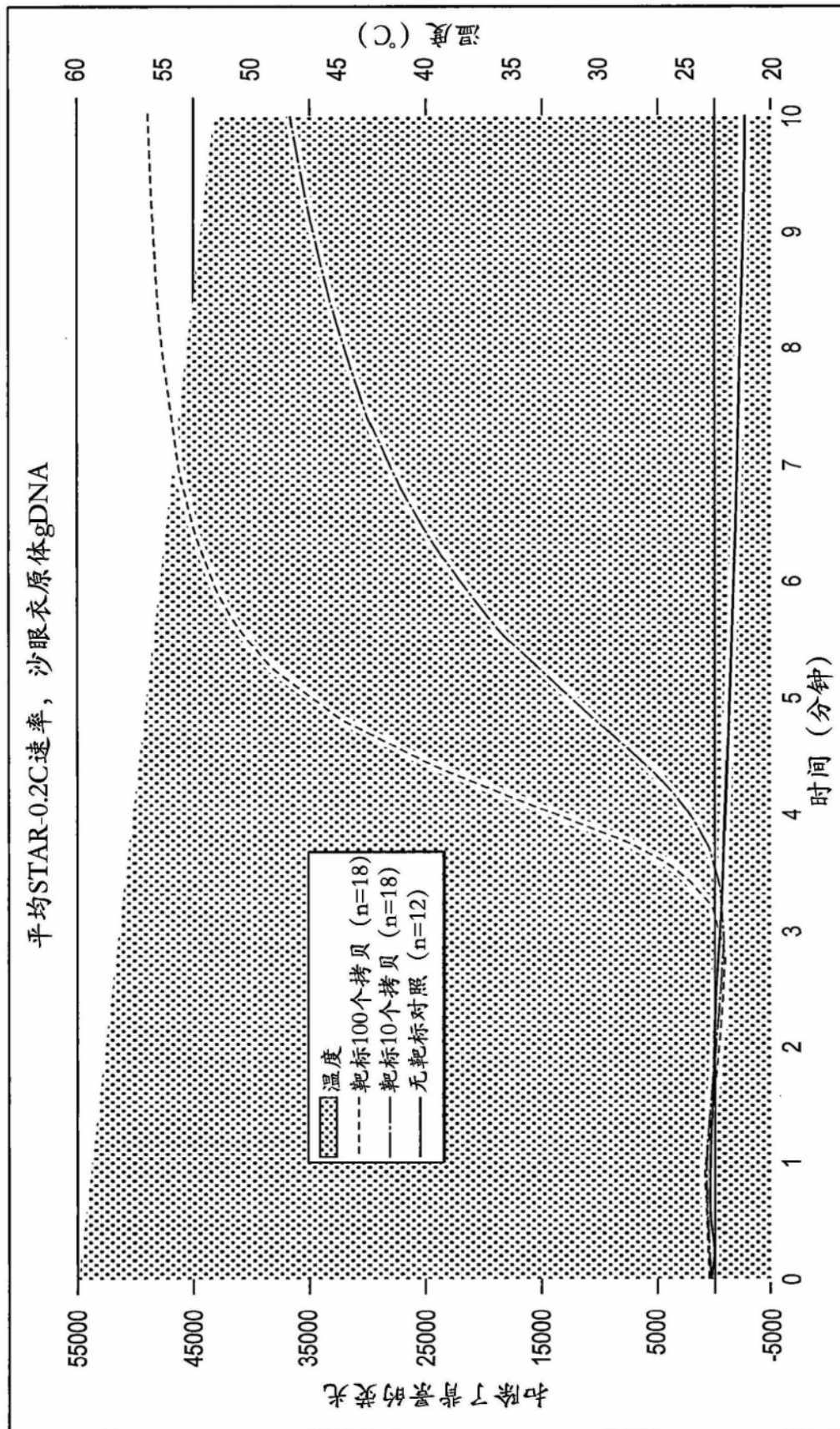


图7

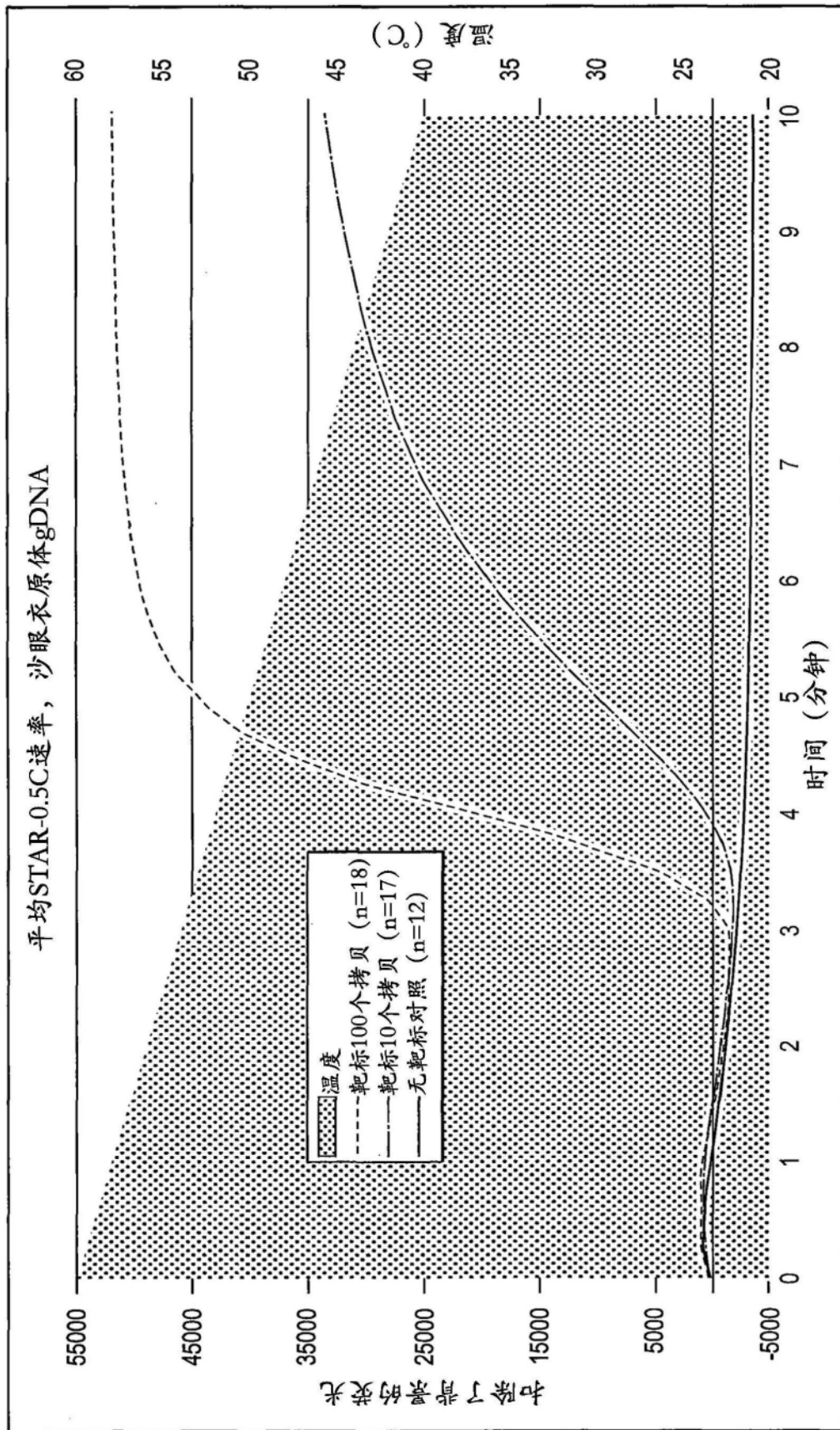


图8

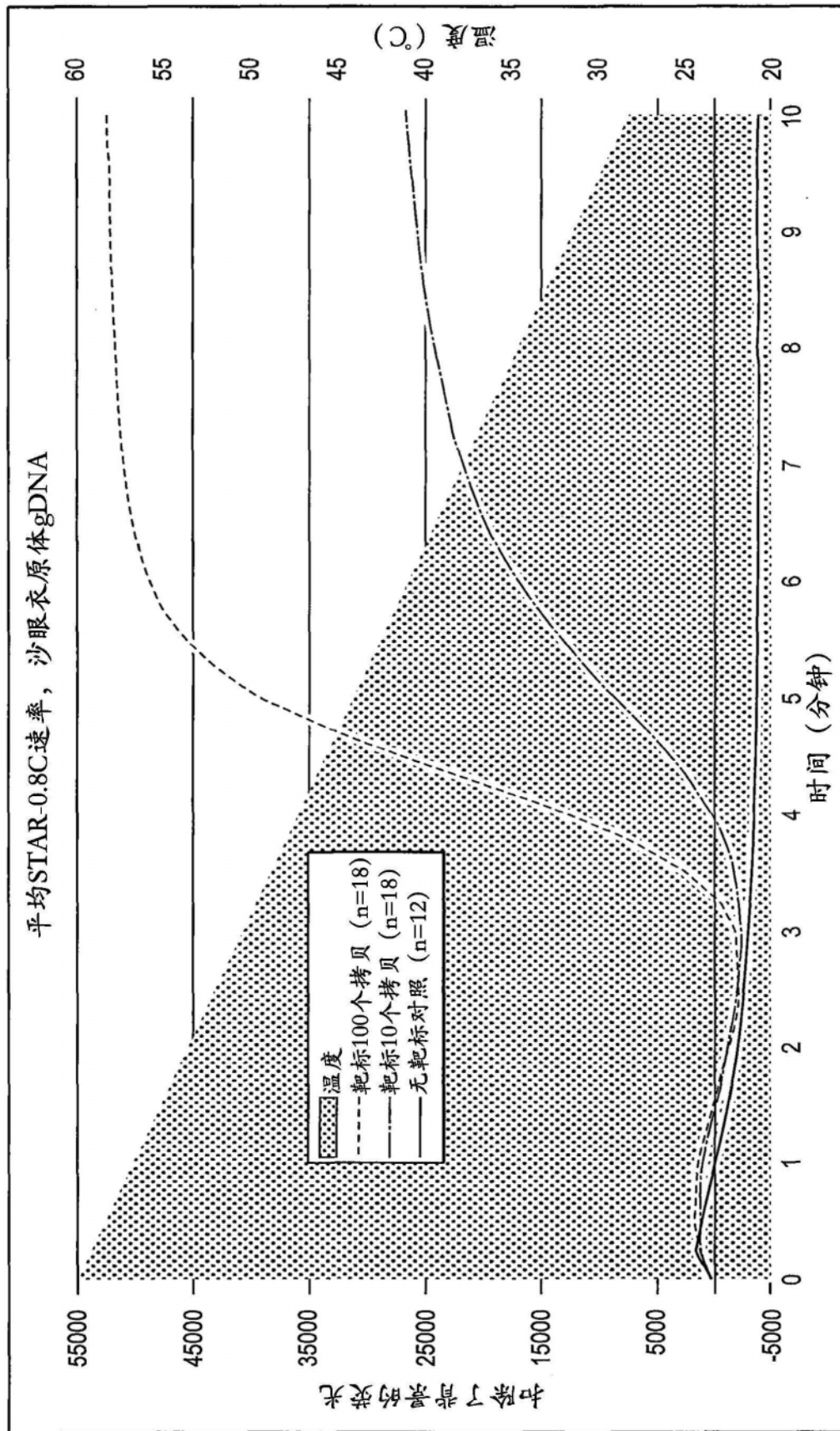


图9

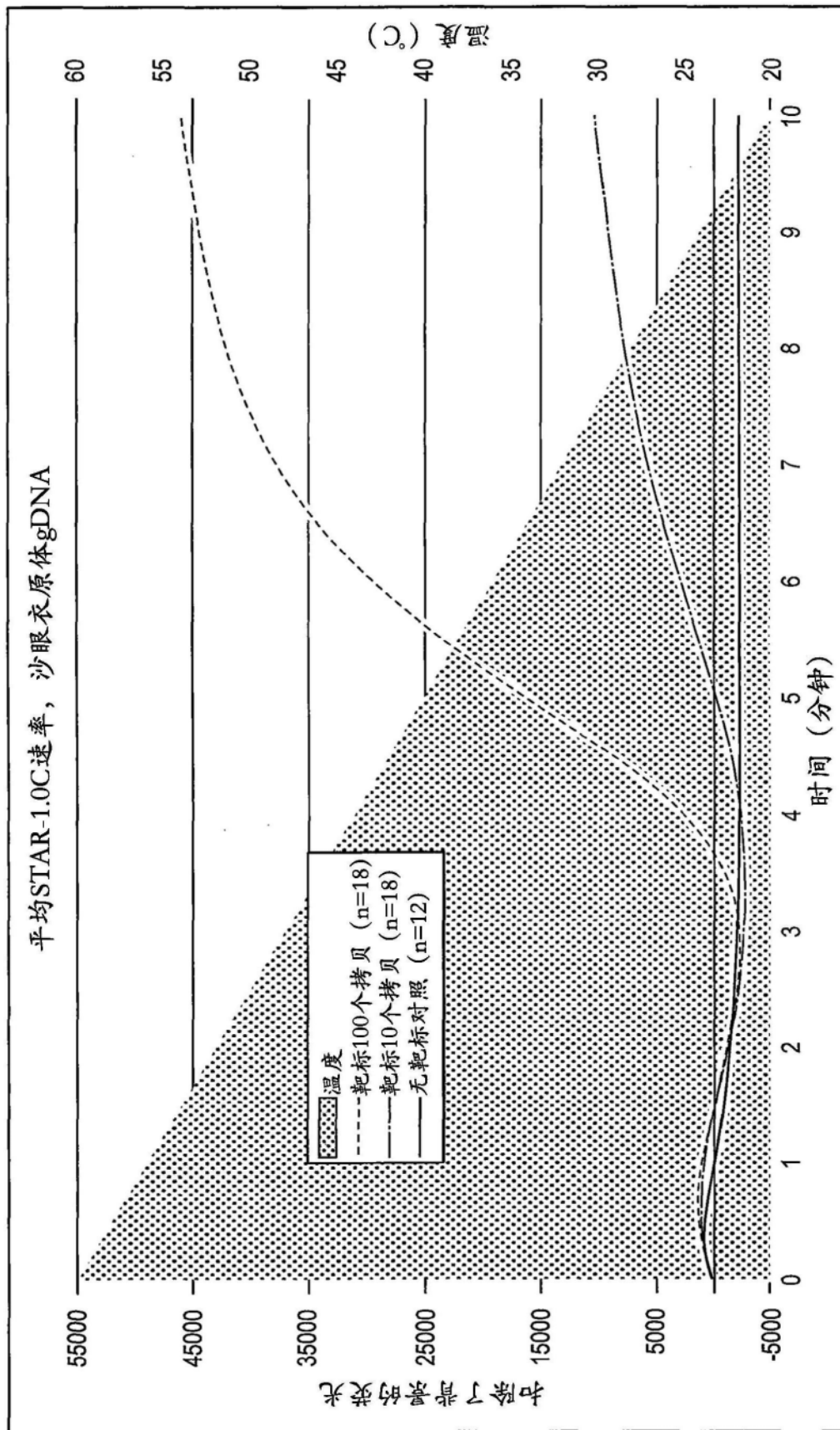


图10

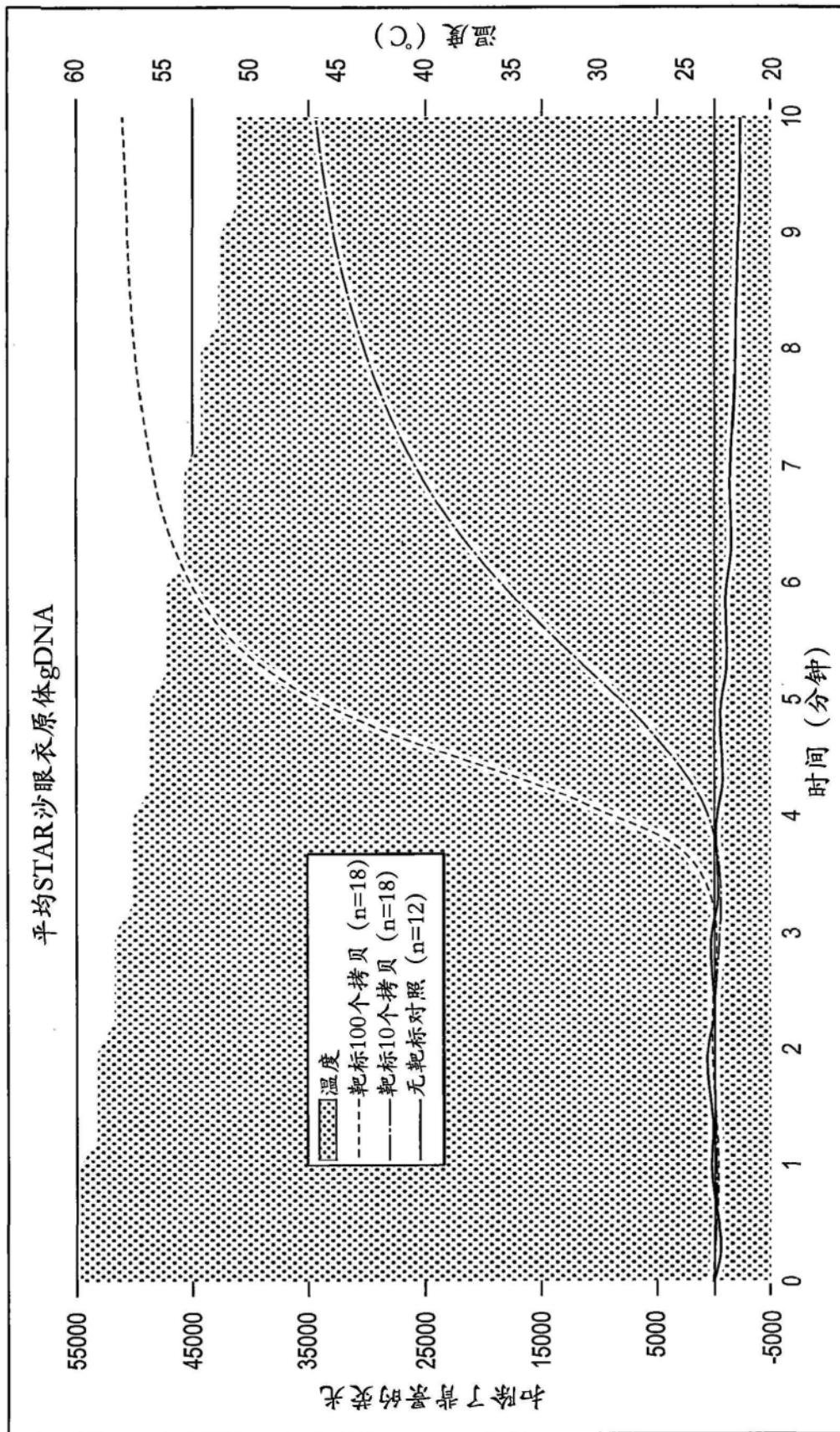


图11

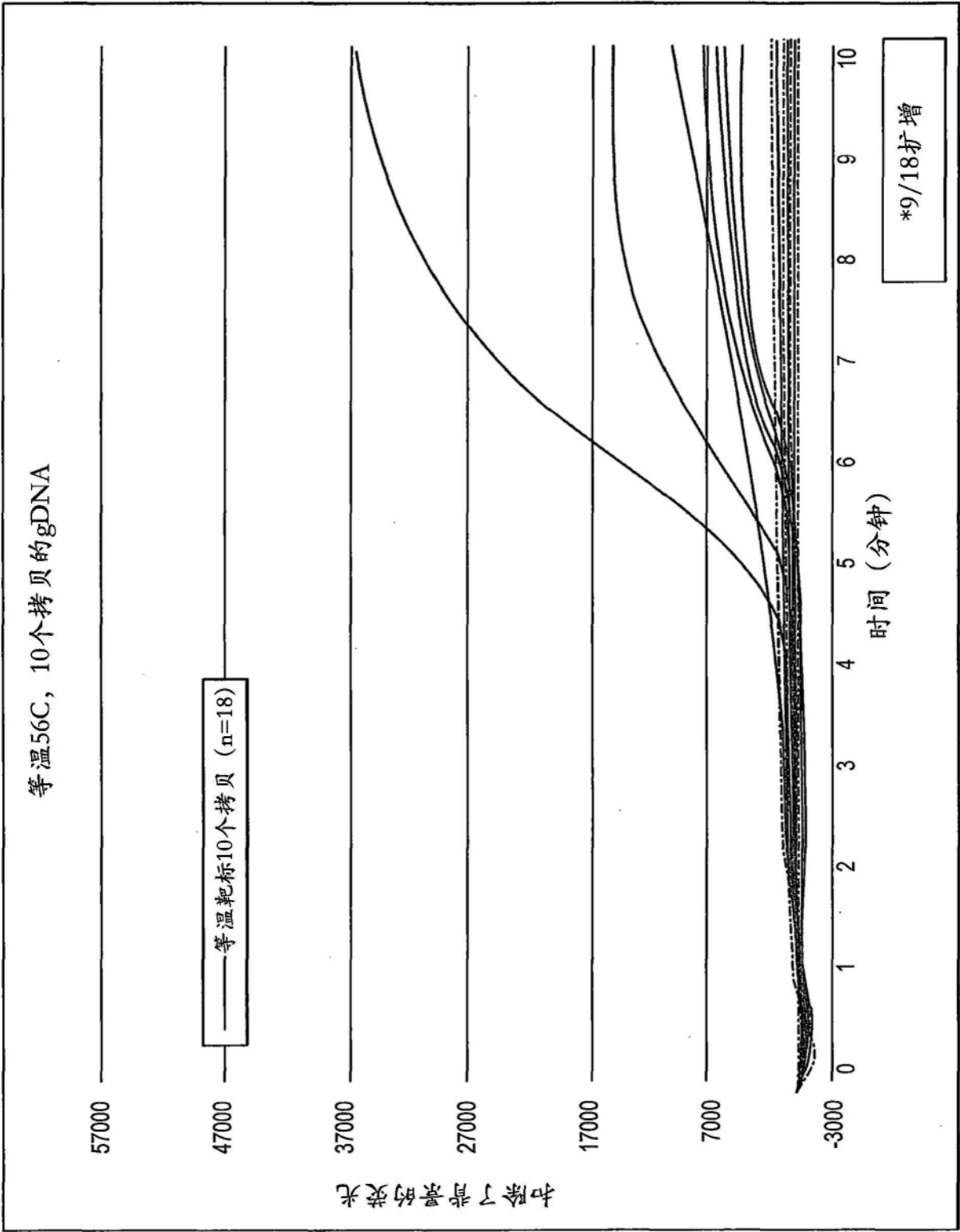


图12A

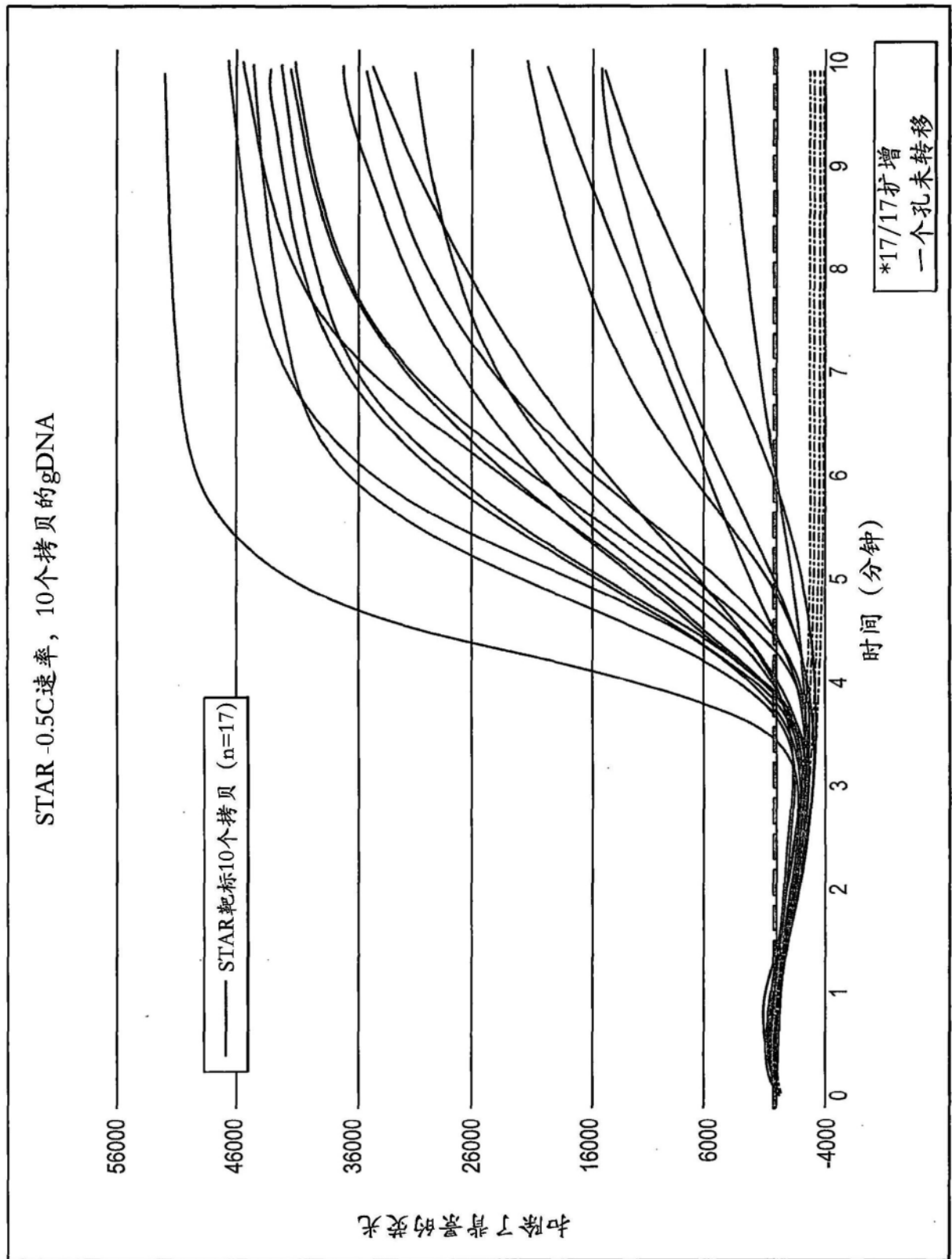


图12B

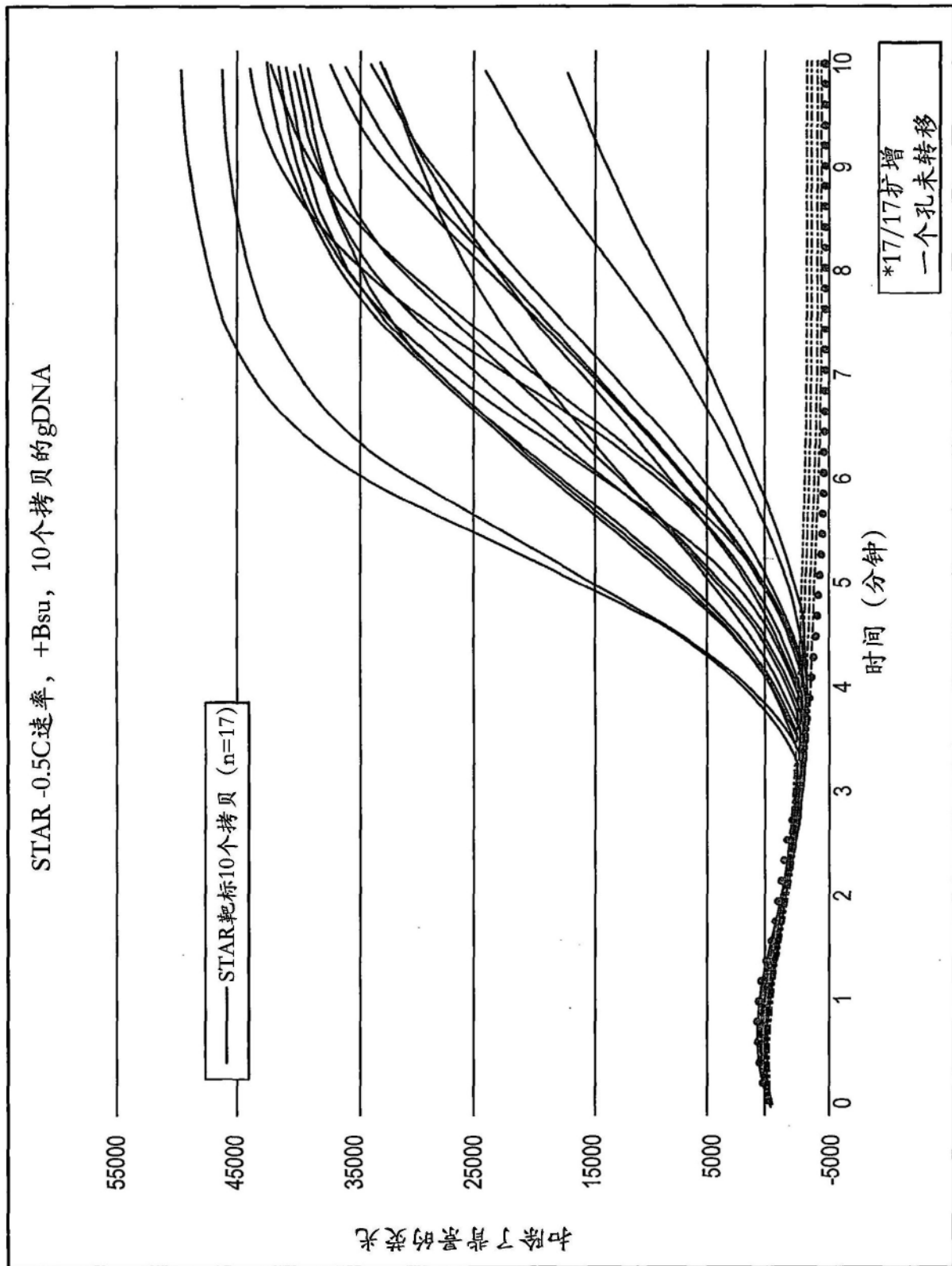


图12C

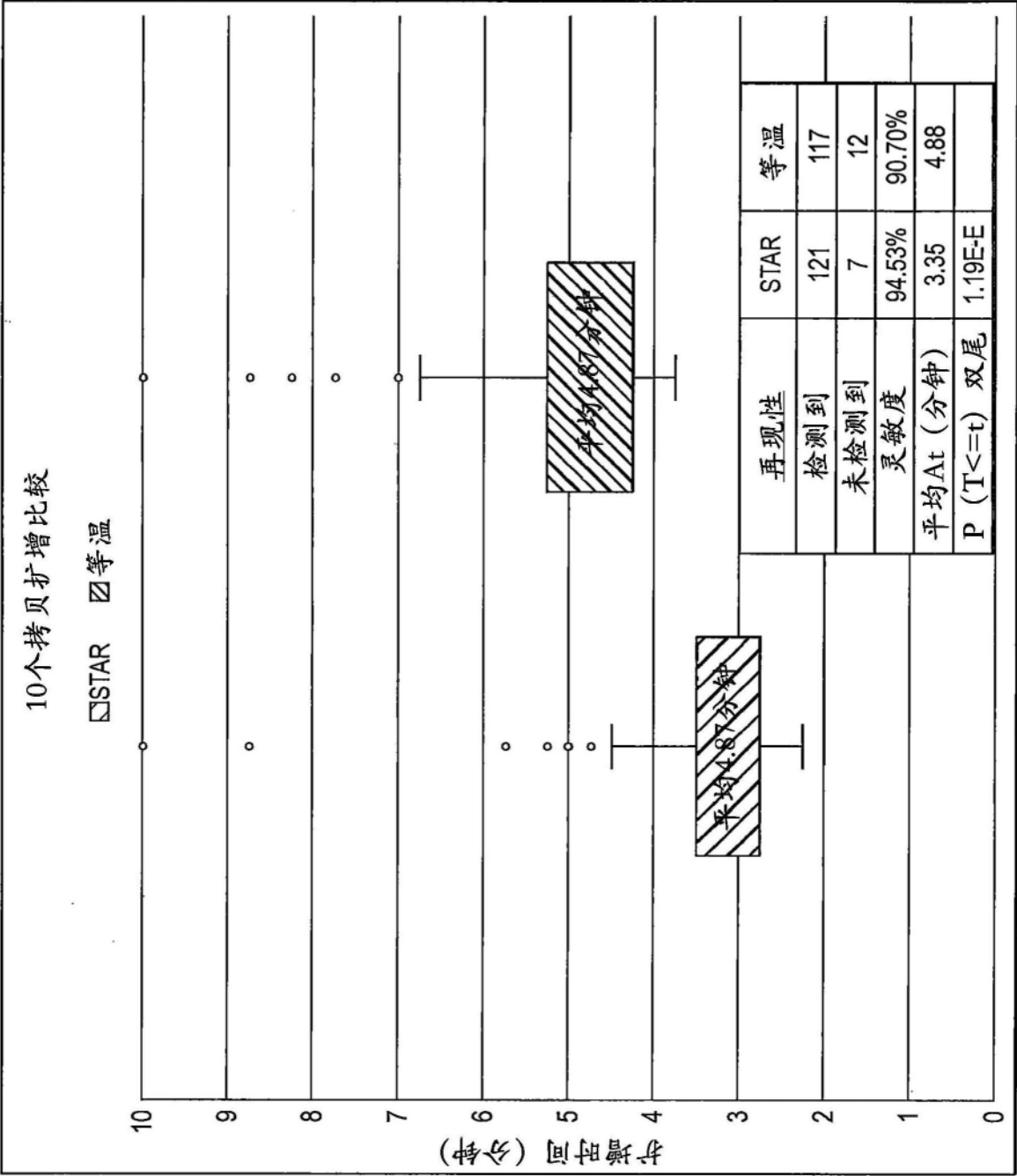


图13

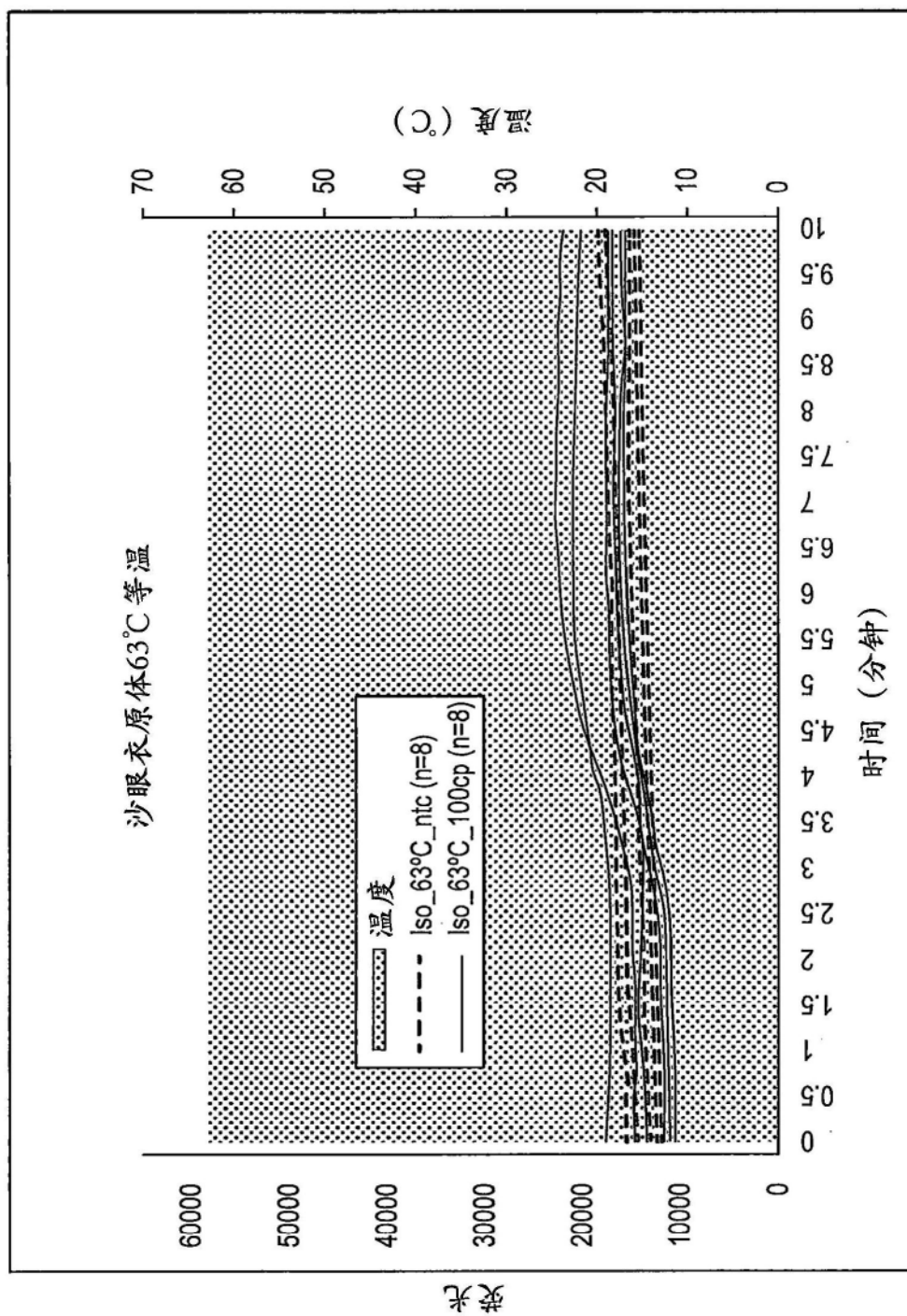


图14A

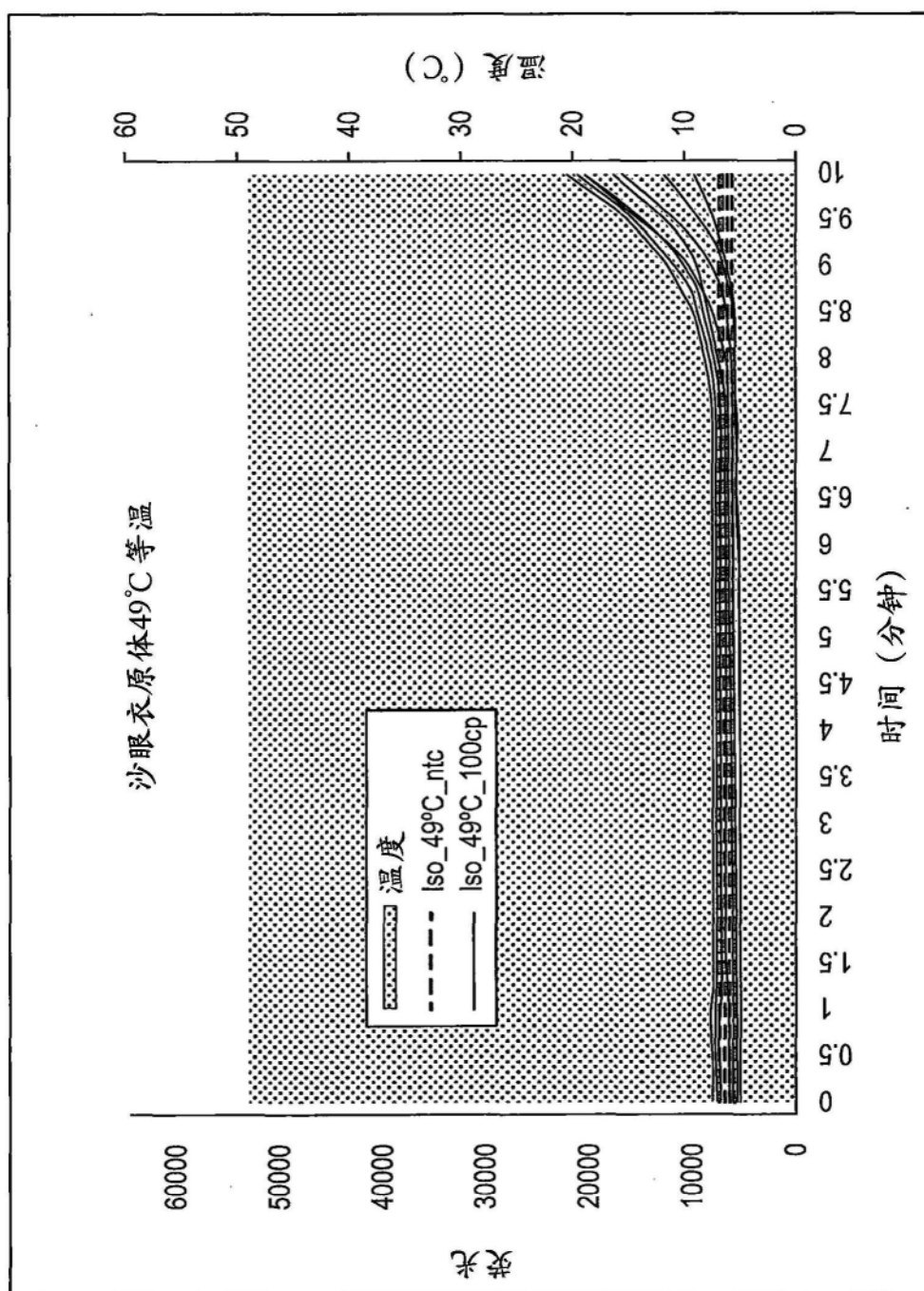


图14B

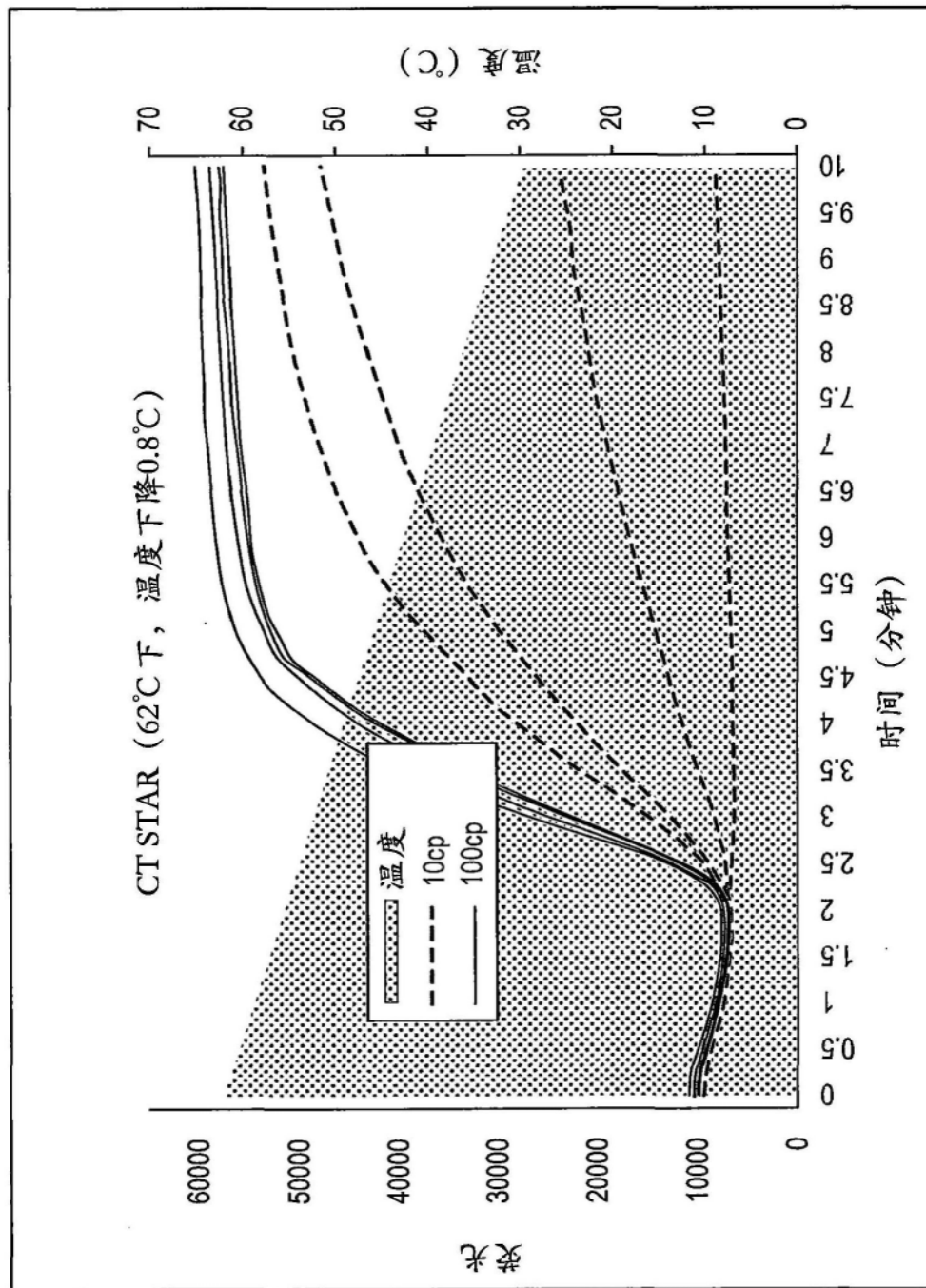


图15A

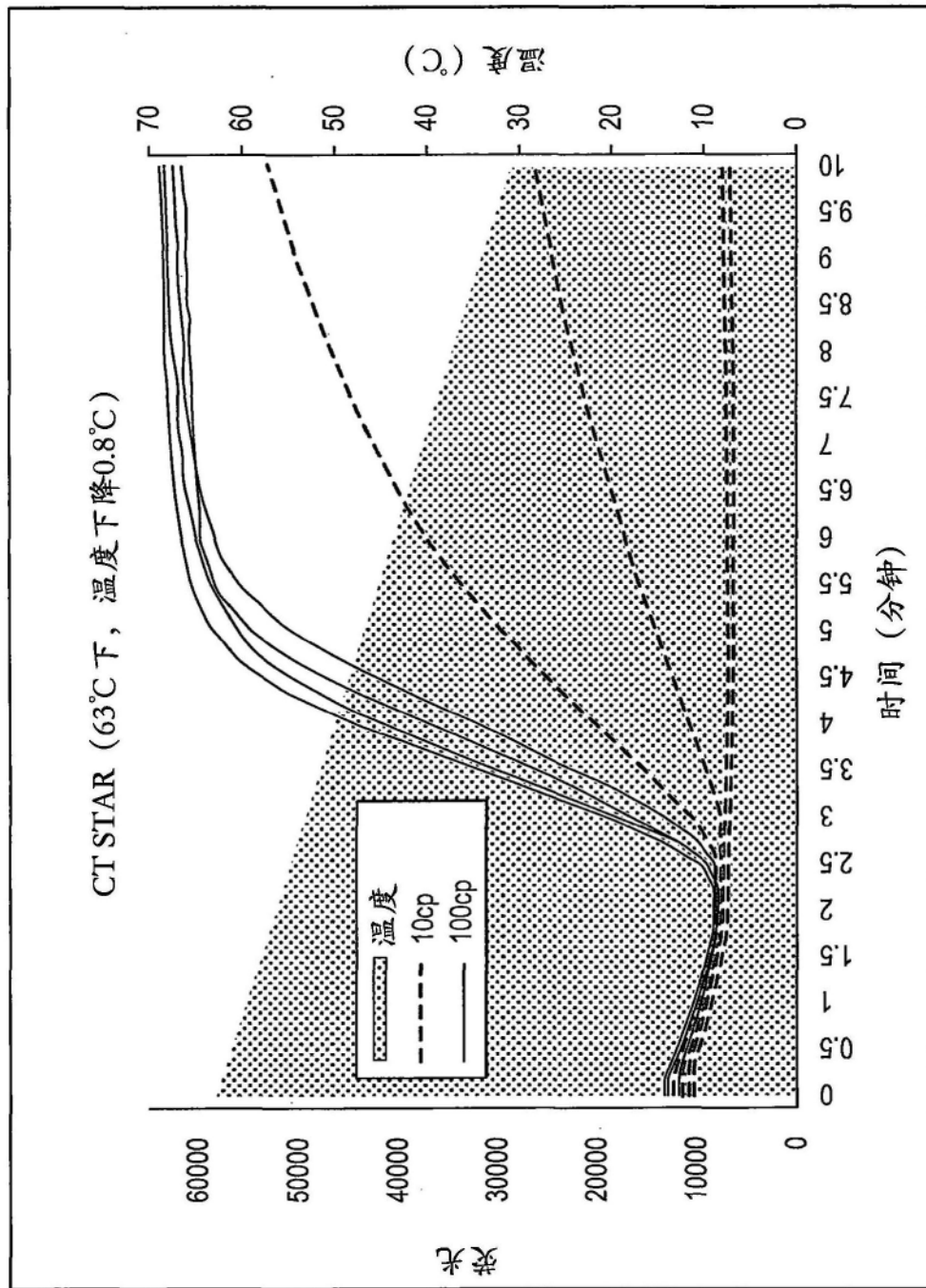


图15B

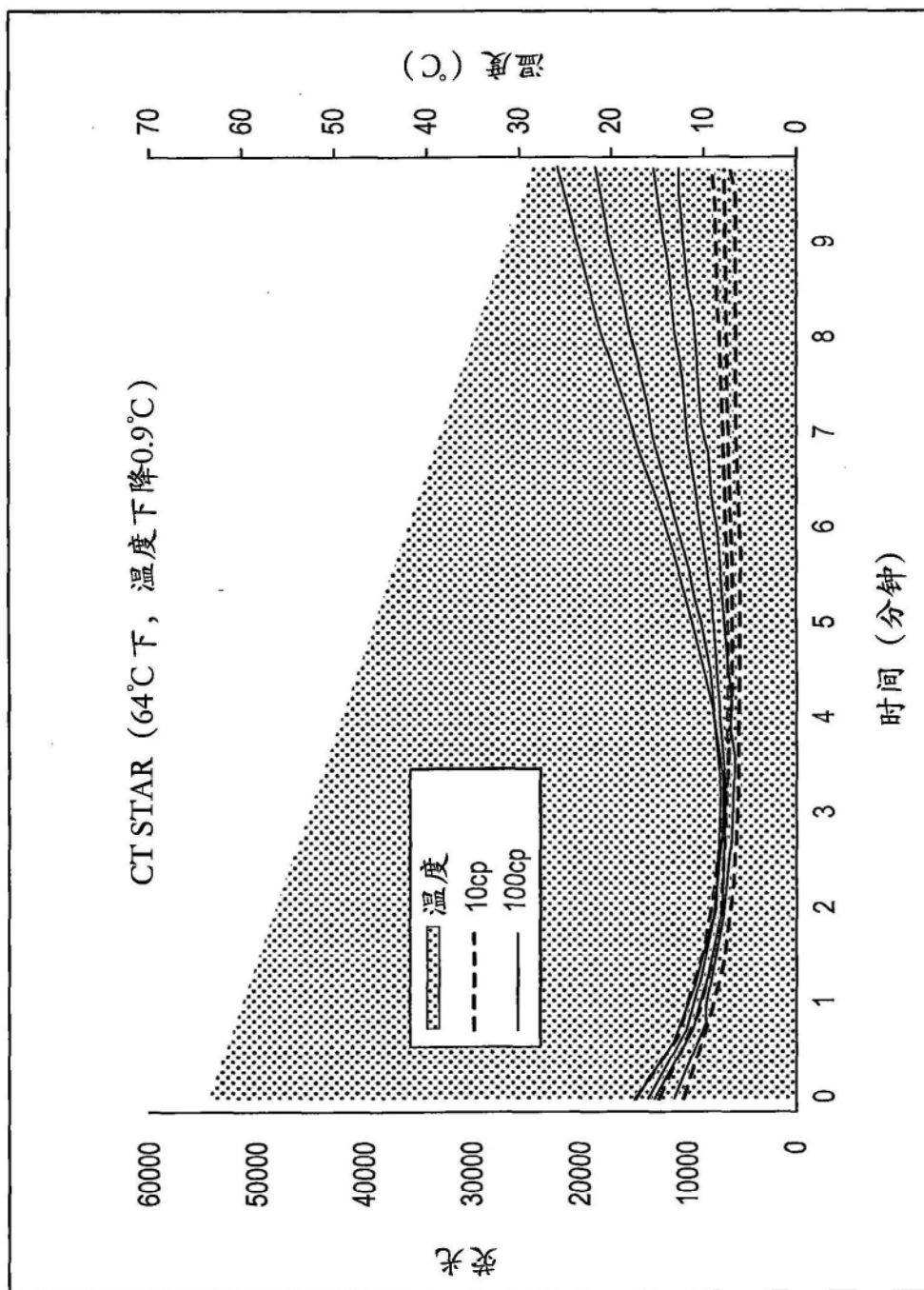


图15C

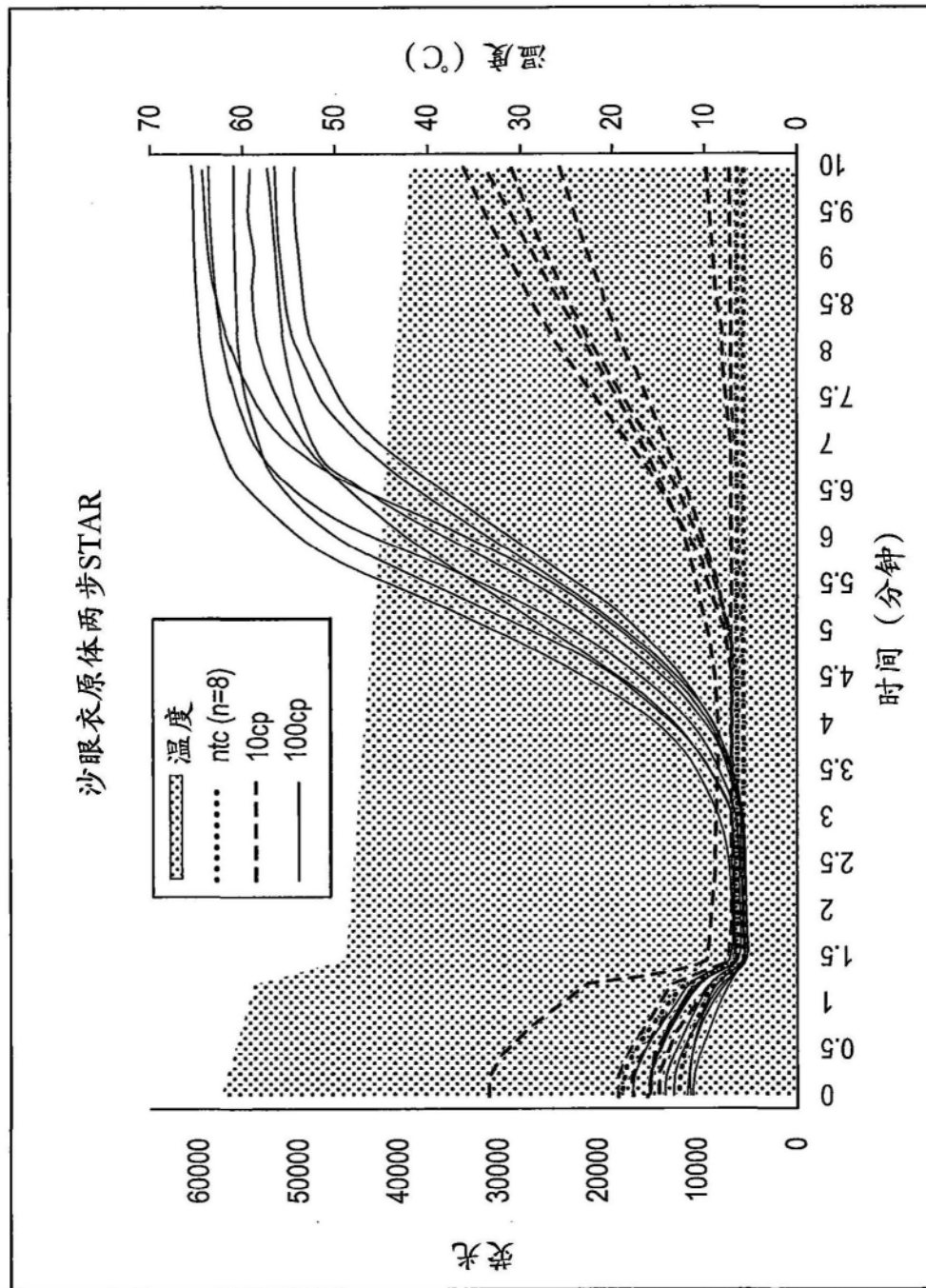


图16A

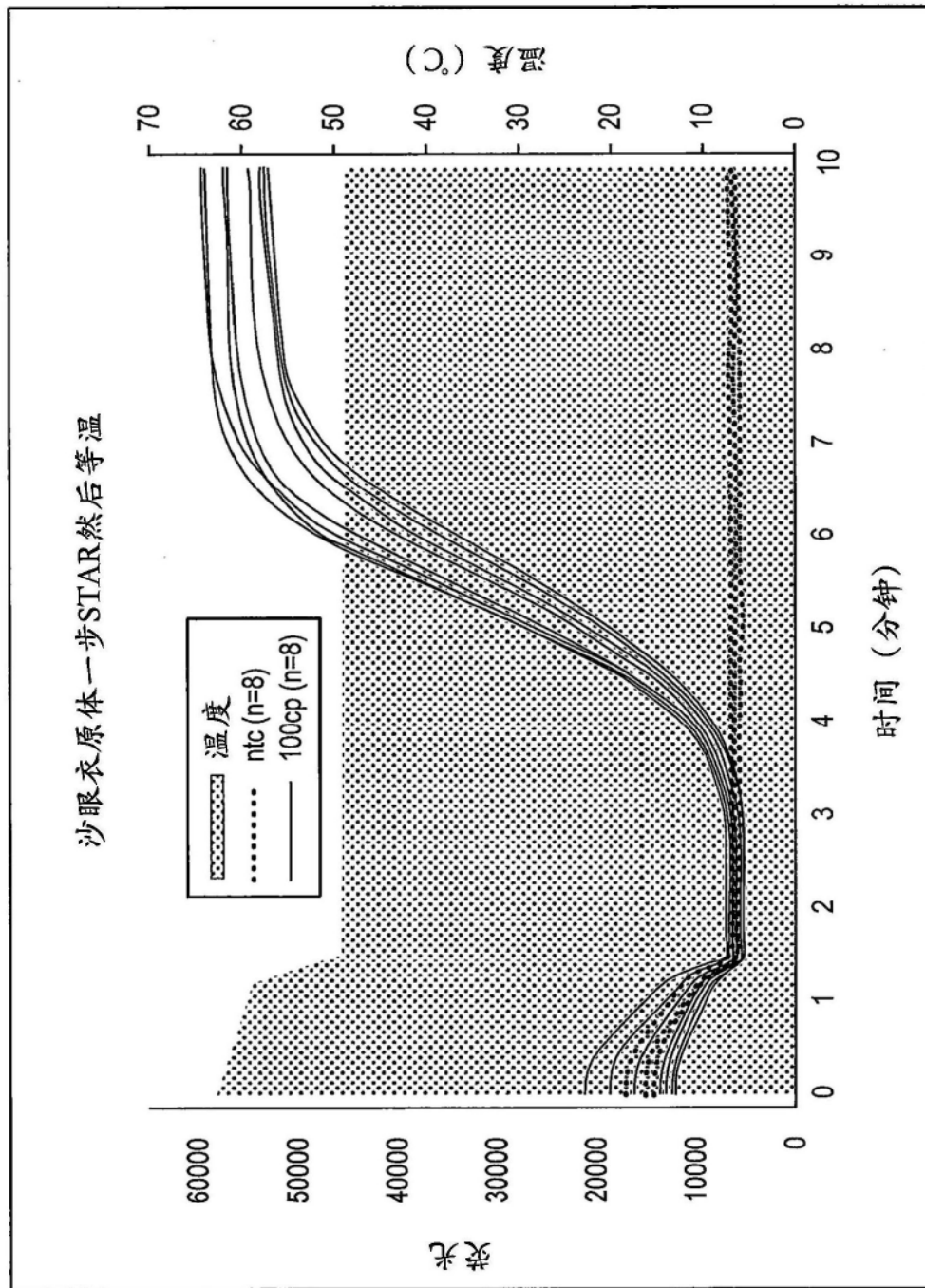


图16B

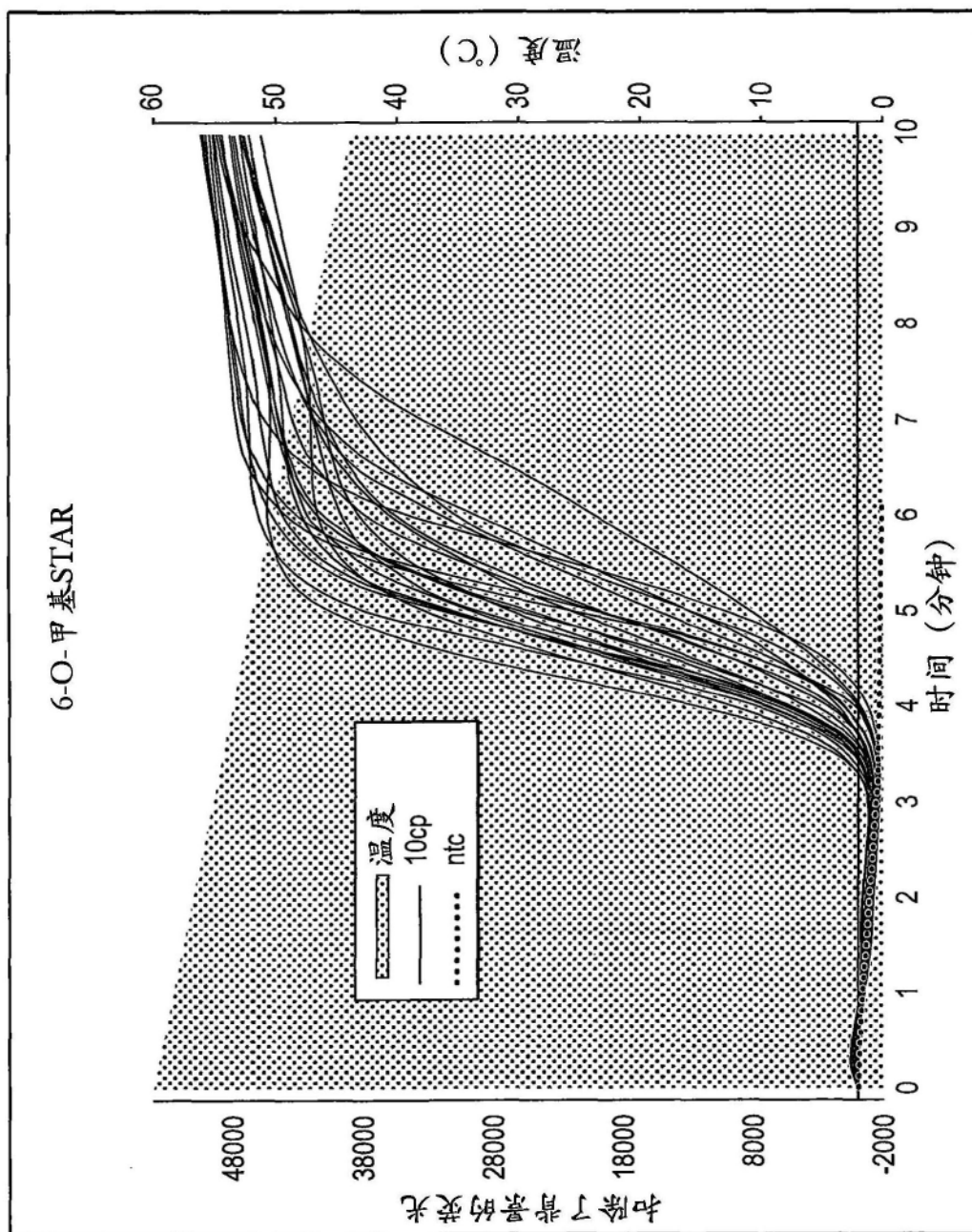


图17A

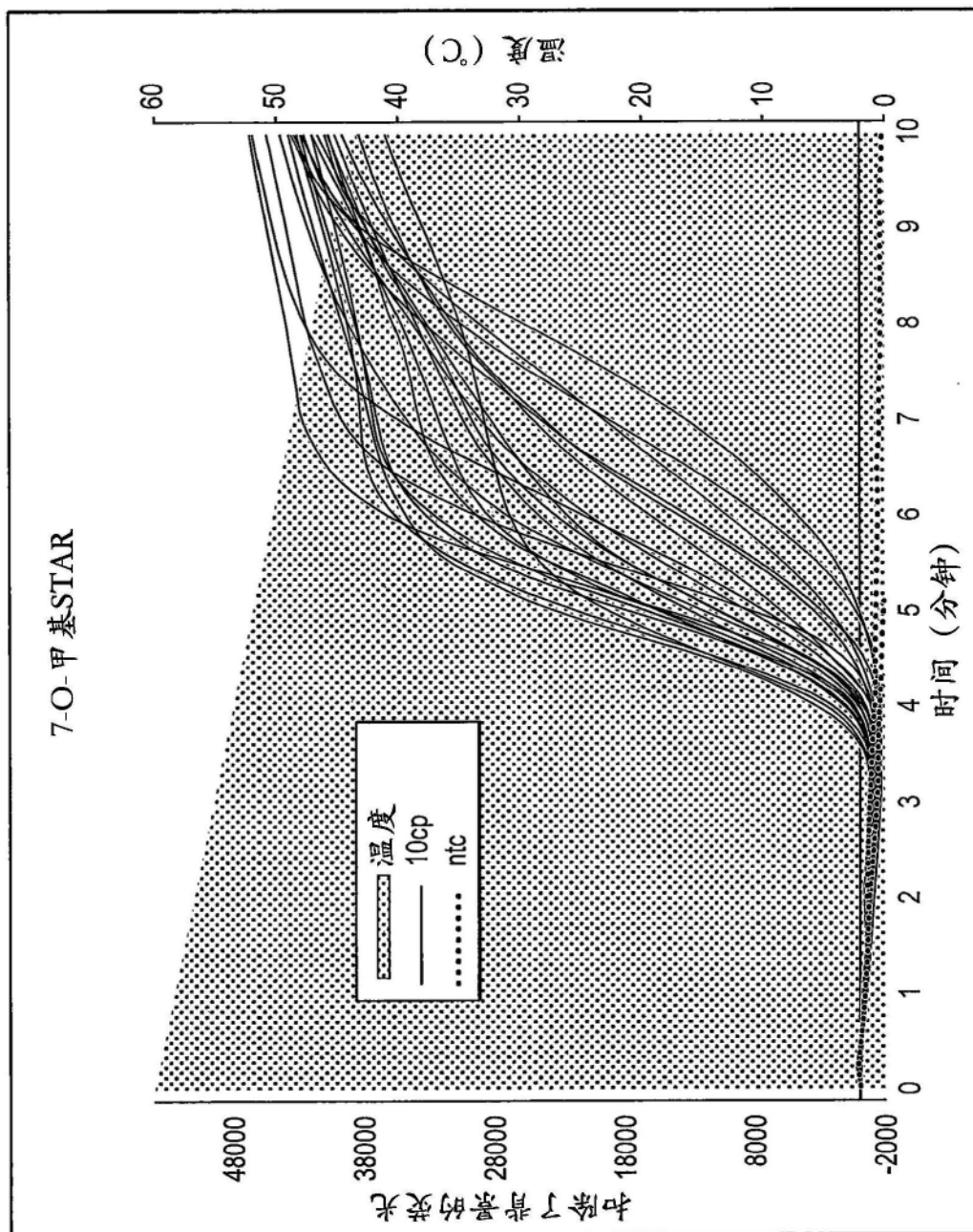


图17B

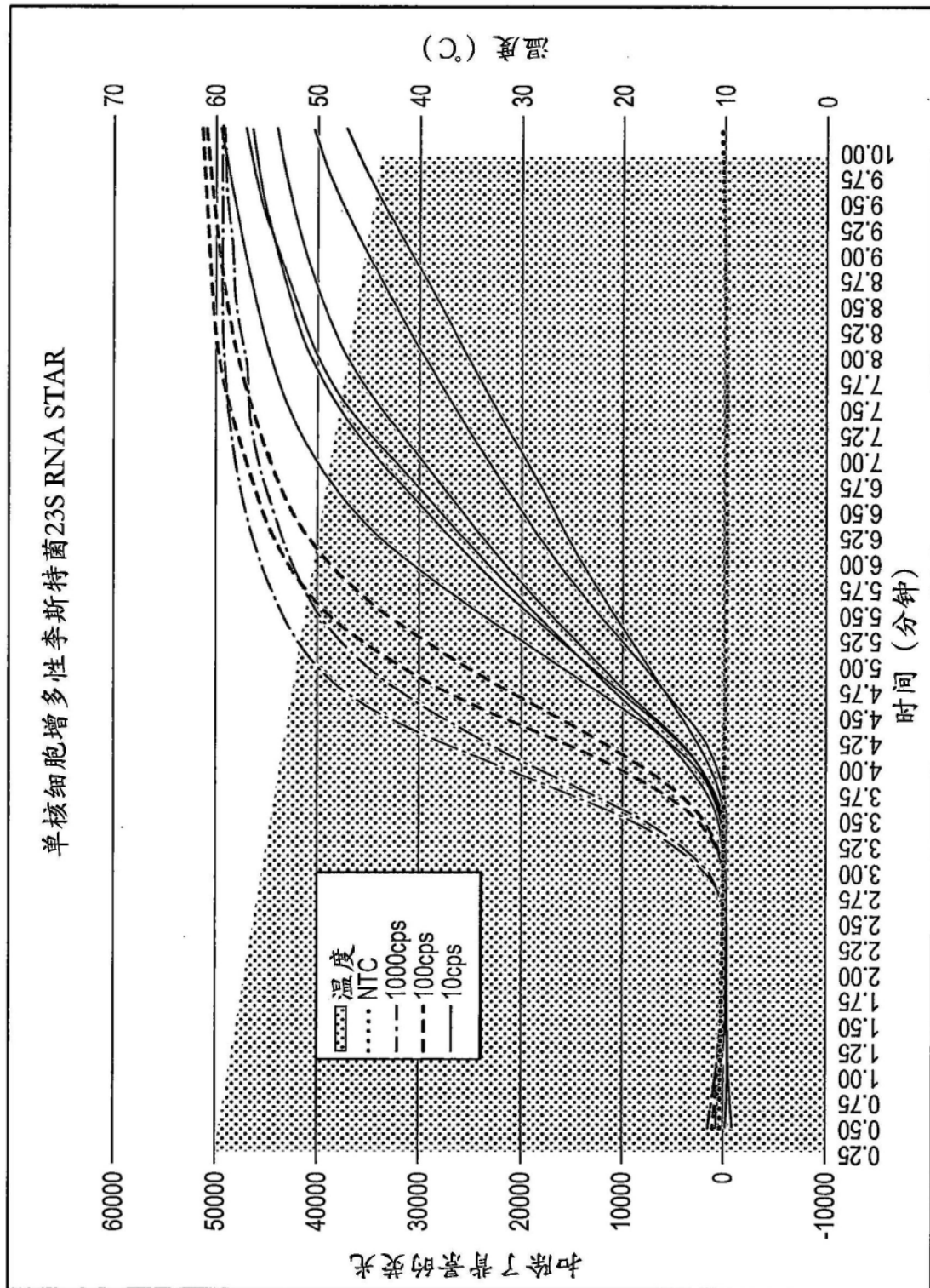


图18